



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2005

**Dora Maria José dos
Santos**

**Influência das pentosanas nas propriedades
funcionais do glúten e amido de trigo**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química, realizada sob a orientação científica do Doutor José António Lopes da Silva, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Doutor António Mendes dos Santos Moderno
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

Doutora Maria Luísa Duarte Beirão da Costa
Professora Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade
Técnica de Lisboa

Doutor José Manuel Abecassis Empis
Professor Associado com Agregação do Instituto Superior Técnico da
Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo
Professora Associada com Agregação da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Maria Pissarra Coelho Gil
Professora Associada da Universidade de Aveiro (co-orientador)

Doutor José António Teixeira Lopes da Silva
Professor Auxiliar da Universidade de Aveiro (orientador)

agradecimentos

Ao Professor Doutor José António Lopes da Silva e à Professora Doutora Ana Gil, quero transmitir o meu sincero agradecimento pela orientação científica prestada ao longo de todo o trabalho, e pela paciência, amizade, simpatia e disponibilidade investidas durante todos estes anos.

À Professora Doutora Ivonne Delgadillo, quero transmitir a minha gratidão pela sua simpatia e por me ter concedido a oportunidade de trabalhar no grupo de Bioquímica e Química dos Alimentos do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

À Dra. Cláudia Gama quero expressar aqui o meu agradecimento profundo por todo o trabalho desenvolvido conjuntamente durante os primeiros anos do projecto. O companheirismo, amizade e a boa disposição foram um marco bastante importante na vida deste projecto.

Ao Professor Andy Rao, professor e investigador do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da New York State Agricultural Experiment Station, Universidade de Cornell, quero agradecer a oportunidade que me concedeu em ali realizar parte do trabalho do projecto, bem como o apoio, hospitalidade e conhecimentos transmitidos. Quero ainda agradecer ao técnico Herb Cooley e restantes colegas do laboratório, Koy, Valéria, Ellen e Andrea, por todo o apoio prestado.

Quero ainda expressar aqui o meu agradecimento às técnicas superiores que estiveram envolvidas na realização de algumas das análises instrumentais, nomeadamente à Dra. Paula Esculcas e Dra. Celeste Azevedo do Departamento de Química, à D. Manuela do Departamento de Cerâmica e Vidro, e à D. Violante do Departamento de Biologia.

Não podia deixar de registar aqui o meu imenso agradecimento aos meus colegas e amigos do departamento de química, nomeadamente à Susana Cardoso, Cláudia Tavares, Helena Sofia, Patrícia Seabra, Alexandra “Lindeza”, Luís Silva e Enrica Alberti, com os quais partilhei as minhas dúvidas, muitas alegrias, poucas tristezas, muitos sonhos e muita amizade.

Finalmente quero agradecer à Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo apoio financeiro concedido ao abrigo do Subprograma Ciência e Tecnologia do 2º Quadro Comunitário de Apoio.



Aos meus pais pelo seu amor, apoio e compreensão...

Ao Ricardo pela paciência indelével e amor incondicional...

À titi Zélita, pela sua força e pelo refúgio sempre pronto e reconfortante...

Ao Pê, pelas muitas brincadeiras adiadas!...

À Néné e ao Fredo.... adoro-vos...

A toda a minha família por todo o apoio e carinho demonstrados....

A todos os meus amigos que, de uma maneira ou de outra, estiveram sempre presentes, nos bons e nos menos bons momentos, e me ajudaram neste projecto.....

.... a todos vocês, o meu muito obrigado por tudo!

resumo

O trabalho apresentado nesta tese pretendeu estudar o efeito das pentosanas hidrossolúveis nas propriedades funcionais do glúten e amido de trigo, ao nível da dinâmica molecular e estrutural, através da aplicação de técnicas de reologia e de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). As amostras de pentosanas hidrossolúveis, glúten e amido foram extraídas a partir de duas variedades portuguesas de trigo, *Amazonas* e *Sorraia*, desenvolvidas na estação nacional de melhoramento de plantas (ENMP, Elvas, Portugal), e caracterizadas por possuírem propriedades tecnológicas distintas.

No Capítulo I é apresentada uma revisão do conhecimento actual sobre a composição e propriedades das farinhas de trigo e seus principais constituintes, apresentando-se a importância de cada um dos componentes, bem como das interações entre si, no processo de panificação. Neste capítulo são ainda apresentados, de uma forma resumida, os fundamentos das principais técnicas analíticas utilizadas, nomeadamente a reologia fundamental e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de sólidos.

No Capítulo II é apresentada a descrição dos métodos de fraccionamento das farinhas de trigo com vista à obtenção e purificação das fracções de amido, glúten e pentosanas hidrossolúveis, bem como a caracterização físico-química das farinhas e de cada uma das fracções obtidas. As farinhas das duas variedades apresentaram como principais diferenças os teores mais elevados de amido e amido danificado para a farinha *Sorraia*. Os glútenes, bem como as pentosanas hidrossolúveis, apresentaram uma composição físico-química semelhante entre as duas variedades.

No Capítulo III apresenta-se o estudo das propriedades reológicas e espectroscópicas das duas variedades de farinhas de trigo, com o objectivo de se determinarem aspectos diferenciadores da funcionalidade, quer ao nível estrutural fundamental quer ao nível molecular. As diferentes propriedades tecnológicas que distinguem as duas variedades de trigo em estudo, nomeadamente o maior grau de dureza, a maior força de glúten e a maior capacidade de absorção de água demonstrada pela farinha *Sorraia*, reflectiram-se no comportamento reológico observado, apresentando esta farinha um módulo complexo superior. Estas propriedades reflectiram-se igualmente no diferente comportamento reológico observado ao longo do tratamento térmico para as duas variedades. A partir da espectroscopia de RMN de ^1H foi possível verificar que as duas variedades de farinha apresentaram uma dinâmica molecular distinta, o que poderá estar na origem da diferente funcionalidade.

No Capítulo IV descreve-se o estudo comparativo dos glútenes extraídos das duas variedades de farinha procurando-se estabelecer uma relação entre os resultados obtidos por ensaios de reologia fundamental e os resultados obtidos por espectroscopia de RMN, numa tentativa de assim se compreender a origem da diferente funcionalidade dos dois glútenes. A principal diferença observada no comportamento viscoelástico dos dois glútenes foi o carácter viscoso mais acentuado verificado para o glúten *Sorraia*. Ao nível da dinâmica molecular foi possível verificar uma maior imobilização dos resíduos ricos em prolina e glutamina no glúten *Sorraia*, o que poderá estar relacionado com a maior força de glúten apresentada por esta variedade. O aquecimento conduziu a valores do módulo de conservação mais elevados, o que se traduziu num aumento da rigidez ao nível molecular, tal como confirmado pelos tempos de relaxação T_{1H} e T_{2H} de protão.

No Capítulo V apresenta-se o estudo do efeito das pentosanas hidrossolúveis (PHS) nas propriedades viscoelásticas e dinâmicas do glúten extraído de cada uma das variedades das farinhas de trigo. A adição de PHS às amostras de glúten exerceu, claramente, uma alteração do comportamento do glúten não só ao nível reológico como ao nível espectroscópico. A presença de PHS provocou um aumento do módulo de conservação e do módulo de perda, numa extensão dependente da quantidade e da origem das PHS. A presença de PHS diminui as alterações irreversíveis que ocorrem no glúten durante aquecimento, evitando ou diminuindo o processo de desnaturação, caracterizado por uma maior imobilização das proteínas.

No Capítulo VI apresenta-se primeiramente a comparação das propriedades de gelificação dos amidos obtidos a partir de cada uma das variedades de farinha de trigo. Posteriormente é apresentado o efeito das PHS nas propriedades de gelificação do amido, procurando-se estabelecer uma relação entre as propriedades reológicas fundamentais e o comportamento ao nível da dinâmica molecular. A presença de PHS conduziu a um aumento das temperaturas de gelatinização e ao aumento do carácter viscoso dos géis formados. O aumento do carácter viscoso dos sistemas constituídos por amido e PHS observado ao nível da reologia traduziu-se no aumento da mobilidade observada ao nível do RMN. A manutenção de um sistema hidratado ao longo do tratamento térmico e a diminuição da taxa de retrogradação devido à presença de PHS no amido foi observada quer ao nível da reologia quer ao nível da espectroscopia de RMN.

Por fim, no Capítulo VII é apresentado um estudo preliminar de amostras reconstituídas, compostas por amido, glúten e PHS. Primeiramente estudaram-se os sistemas constituídos apenas por glúten e amido. A adição de uma maior quantidade de glúten conduziu a valores do módulo de conservação mais elevados, o que, na dinâmica molecular se traduz na formação de uma matriz mais rígida. A adição de PHS às amostras constituídas por glúten e amido conduziu ao aumento do carácter viscoso dos sistemas. A manifestação do carácter mais viscoso deverá estar relacionado com maior mobilização da amostra ao nível molecular tal como verificado pela espectroscopia de RMN. A presença de PHS mostrou ser bastante importante para a manutenção de um sistema mais hidratado ao longo do tratamento térmico, contribuindo para a diminuição da taxa de retrogradação do amido, e consequente aumento do tempo de vida útil do produto final.

abstract

The work presented in this thesis targeted the study of the effect of water soluble pentosans on the functional properties of gluten and wheat starch, concerning molecular and structural dynamics, through the use of rheology and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The samples of water soluble pentosans, gluten and starch were extracted from two Portuguese wheat varieties, *Amazonas* and *Sorraia*, grown at the National Plant Breeding Station in Elvas (ENMP, Elvas, Portugal), and characterized by their distinct technological properties.

Chapter I presents a review of the present knowledge on the composition and properties of wheat flours and their main components, and the importance of each of the components, as well as their interactions, in breadmaking. This chapter also presents, in a summarized way, the fundamentals of the main analytical techniques used, namely fundamental rheology and solid state nuclear magnetic resonance spectroscopy.

Chapter II presents the description of the fractioning methods of wheat flours as to the obtention and purification of starch, gluten and water soluble pentosans fractions, as well as the physical and chemical characterization of the flours and of each of the fractions obtained. *Sorraia* flour presented higher levels of starch and damaged starch as the main differences between the two wheat flour varieties. The gluten samples, as well as the water soluble pentosans, showed a very similar physical and chemical composition in both varieties.

Chapter III presents the study of rheological and spectroscopical properties of the two varieties of wheat flour, as to find distinct characteristics of the different functionality at both fundamental structural and molecular levels. The different technological properties which differentiate the two wheat flour varieties under study, namely the higher hardness level, the greater gluten strength and the greater water absorption capacity shown by *Sorraia* flour, were reflected in the observed rheological behaviour, this flour showing a higher complex modulus. These properties were exhibited in the different rheological behaviour observed between the two wheat flours, during the heat treatment. By means of ^1H -NMR spectroscopy it was possible to observe that both flour varieties showed distinct molecular dynamics, which may have given origin to the different functionality.

Chapter IV describes a comparative study of gluten samples extracted from both flour varieties, as to establish a link between results obtained by means of fundamental rheological experiments and results obtained through NMR spectroscopy, as to understand the origin the different functionality of the two glutens. The main difference observed in the viscoelastic behaviour between the two gluten samples was the stronger viscous character exhibited by *Sorraia* gluten. As to the molecular dynamics, it was possible to observe a higher rigidity of proline and glutamine rich residues in *Sorraia* gluten, which may be related to the higher gluten strength shown by this variety. Heating led to higher values of storage modulus which was reflected by an increase in rigidity at molecular level, as confirmed by the T_{1H} and T_{2H} proton relaxation values. Chapter V covers the study of the effect of water soluble pentosans on the viscoelastic and dynamics properties. The addition of water soluble pentosans to gluten samples clearly produced a change in the behaviour

of the gluten, not only at rheological but also at spectroscopical levels. The addition of water soluble pentosans to the gluten samples contributed to the increase of both storage and loss moduli values, in an extension dependent on both the percentage and the origin of the added water soluble pentosans. The presence of the water soluble pentosans decreases irreversible changes which occur in the gluten during heating, avoiding or hindering the process of gluten denaturation, characterized by an increase in protein rigidity.

The first part of Chapter VI shows the comparison between the gelatinization properties of starches obtained from each of the wheat flour varieties. Further on, the effect of water soluble pentosans on the gelatinization properties of starch is shown. The presence of water soluble pentosans led to an increase of gelatinization temperatures and to the increase in the viscous character of the gels formed. The increase in the viscous character of the systems made up by starch and water soluble pentosans observed at rheological level was reflected on the increase of mobility observed by means of NMR. The maintenance of a hydrated system during the heating process and the decrease in the rate of starch retrogradation due to the presence of water soluble pentosans in the starch were observed through both rheology and NMR spectroscopy.

Finally, Chapter VII presents a preliminary study of reconstituted samples made up by starch, gluten and water soluble pentosans. First, a study of the systems composed just by starch and gluten was carried out. The addition of a larger amount of gluten resulted in higher storage modulus values, which, in molecular dynamics is shown in the building up of a more rigid matrix. The addition of water soluble pentosans to the samples made up by gluten and starch led to the increase in the viscous character of the systems. The display of a more viscous character may have resulted from an increase in mobility at a molecular level, as seen through NMR spectroscopy. The presence of water soluble pentosans proved to be quite important in the maintenance of a more hydrated system during the heating process, contributing to a decrease in the starch retrogradation rate and, consequently, to an increase in the shelf-life time of the final product.

Lista de Abreviaturas

AG	arabinogalactanas
AMA	referente à variedade <i>Amazonas</i>
Ara	arabinose
Ax	arabinoxilanas
C/L	com lípidos (referente à farinha original)
CP	Polarização cruzada (do inglês <i>cross polarization</i>)
CPMG	sequência Carr-Purcell-Mebom-Gill utilizada como método para a determinação do tempo de relaxação transversal
D ₂ O	água deuterada
EtOH	etanol
G*	módulo complexo
G'	módulo de conservação
G''	módulo de perda
Gal	galactose
Glc	glucose
H ₂ O	água
HMW	elevada massa molecular (do inglês <i>high molecular weight</i>)
HOD	água deuterada
HS	hidrossolúveis
LB	Line broadening
LMW	baixa massa molecular (do inglês <i>low molecular weight</i>)
Man	manose
MAS	rotação segundo o ângulo mágico (do inglês <i>magic angle spinning</i>)
Mét. 1	referente ao método 1 utilizado na preparação das amostras
Mét.2	referente ao método 2 utilizado na preparação das amostras
n.d.	não detectável
N.D.	não determinável
NIR	reflectância de infra-vermelho próximo (do inglês <i>Near Infrared Reflectance</i>)
ns	número de scans
PHS	pentosanas hidrossolúveis

PHS-cr	mistura com pentosanas hidrossolúveis de origem cruzada
PHS-or	pentosanas hidrossolúveis originais
PNHS	pentosanas não hidrossolúveis
QE	quebra de estrutura relativa
QETR	quebra de estrutura total relativa
REA	recuperação relativa da estrutura durante o arrefecimento
REE	recuperação relativa da estrutura durante o envelhecimento
RMN	ressonância magnética e nuclear
S/L	deslipidificadas
SDS-PAGE	electroforese em gel de poliacrilamida e dodecilsulfato de sódio (do inglês <i>sodium dodecylsulphate – poliacrilamide gel electrophoresis</i>)
-SH	grupos tiol ou sulfidrílo
SOR	referente à variedade <i>Sorraia</i>
SPE	Excitação de impulso único (do inglês <i>single pulse excitation</i>)
SR	velocidade de rotação (do inglês <i>spinning rate</i>)
S-S	ligações dissulfeto
T _{1H}	tempo de relaxação longitudinal
T _{2H}	tempo de relaxação transversal
Tan δ	tangente ao ângulo de perda
T _{gel}	temperatura de gelatinização do amido
T _{oG}	temperatura de início de transição do amido
T _{oAL}	temperatura de início da dissociação do complexo amilose-lípidos
T _{oR}	temperatura de início de transição após retrogradação
T _{pG}	temperatura do pico da transição do amido
T _{pAL}	temperatura do pico da dissociação do complexo amilose-lípidos
T _{pR}	temperatura do pico da transição após retrogradação
Xil	xilose
ΔH_G	entalpia de gelatinização
ΔH_R	entalpia de transição após retrogradação
ΔH_{AL}	entalpia da dissociação do complexo amilose-lípidos
$\Delta v_{1/2}$	largura a meia altura
δ	ângulo de perda ou de fase (parâmetro da reologia)
δ	desvio químico em ppm (parâmetro da espectroscopia de RMN)

ε	deformação linear ou uniaxial
γ	deformação
$\dot{\gamma}$	taxa de corte
$[\eta]$	viscosidade intrínseca
η^*	viscosidade complexa
η_a	viscosidade aparente
η_{rel}	viscosidade relativa
η_{sp}	viscosidade específica
σ	tensão
τ	tempo de intervalo
ω	frequência de oscilação

Índice Geral

Júri.....	iii
Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Lista de abreviaturas.....	xi
Índice.....	xv
Prefácio	xxi

Capítulo I

Introdução e Revisão de Assuntos

I. 1. FARINHA DE TRIGO E SEUS COMPONENTES	3
I. 1.1. O Trigo.....	3
I. 1.2. A Farinha de Trigo.....	4
I. 1.3. Componentes Principais da Farinha de Trigo	6
I. 1.3.1. Amido	6
I. 1.3.2. Proteínas	13
I. 1.3.3. Constituintes menores.....	21
I. 1.4. Interações entre os componentes e sua importância na panificação.....	26
I. 1.4.1. Interações com a água	26
I. 1.4.2. Interações Amido-Proteínas.....	28
I. 1.4.3. Interações Amido-Lípidos.....	31
I. 1.4.4. Interações Proteína-Lípidos	33
I. 1.4.5. Interações Proteína-Proteína	35
I. 1.4.6. Interações que envolvem as pentosanas hidrossolúveis.....	37
I. 2. REFERÊNCIA A ALGUNS DOS MÉTODOS DE ESTUDO DAS PROPRIEDADES DAS FARINHAS DE TRIGO E COMPONENTES	38
I. 2.1. Reologia	38
I. 2.1.1. Comportamentos Reológicos.....	40
I. 2.1.2. Estudo do Comportamento Viscoelástico	42
I. 2.1.3. Instrumentos de medição do comportamento reológico.....	49
I. 2.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	54
I. 2.2.1. Interações de spin nuclear	54
I. 2.2.2. Momento magnético, campo magnético e precessão nuclear	56

I. 2.2.3. Relaxação e Dinâmica Molecular	60
I. 2.2.4. Técnicas de RMN de sólidos para a observação de spins pouco abundantes	68

Capítulo II

Fraccionamento e caracterização físico-química das farinhas de trigo das cultivares *Amazonas* e *Sorraia*

II. 1. INTRODUÇÃO	75
II. 2. MATERIAIS E MÉTODOS	75
II. 2.1. Fraccionamento das Farinhas.....	75
II. 2.1.1. Purificação do Glúten	78
II. 2.1.2. Purificação do Amido	78
II. 2.1.3. Sub-fraccionamento do amido em fracções de tamanhos de grânulos diferentes ...	79
II. 2.1.4. Extracção das Pentosanas Hidrossolúveis	79
II. 2.2. Caracterização Físico-Química	80
II. 2.2.1. Farinhas.....	80
II. 2.2.2. Glúten	82
II. 2.2.3. Amido	82
II. 2.2.4. Pentosanas Hidrossolúveis	83
II. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
II. 3.1. Caracterização das farinhas	84
II. 3.2. Fraccionamento das farinhas.....	85
II. 3.3. Caracterização das Fracções Isoladas	87
II. 3.3.1. Glúten	87
II. 3.3.2. Amido	87
II. 3.3.3. Pentosanas Hidrossolúveis	93
II. 6. CONCLUSÕES.....	97

Capítulo III

Propriedades Reológicas e espectroscópicas das farinhas de trigo *Amazonas* e *Sorraia*

III. 1. INTRODUÇÃO	101
III. 2. MATERIAIS E MÉTODOS	104

III. 2.1. Farinhas.....	104
III. 2.2. Preparação das amostras	104
III. 2.3. Caracterização Reológica das Farinhas de Trigo	106
III. 2.4. Caracterização das Farinhas de Trigo por RMN do estado sólido.....	107
III. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	109
III. 3.1. Comportamento das farinhas aquando da hidratação	109
III. 3.2. Caracterização Reológica	110
III. 3.2.1. Identificação da zona de comportamento viscoelástico linear.....	111
III. 3.2.2. Caracterização das amostras hidratadas à temperatura ambiente	112
III. 3.2.3. Efeito do Tratamento Térmico.....	119
III. 3.2.4. Comportamento viscoelástico após o ciclo de aquecimento-arrefecimento.....	124
III. 3.3. Caracterização das farinhas de trigo por RMN do estado sólido	127
III. 3.3.1. Caracterização por espectroscopia de RMN de ^{13}C	127
III. 3.3.2. Caracterização por espectroscopia RMN de ^1H	138
III. 4.....CONCLUSÕES	161

Capítulo IV

Caracterização reológica e espectroscópica do glúten extraído das farinhas de trigo *Amazonas* e *Sorraia*

IV. 1. INTRODUÇÃO.....	167
IV. 2. MATERIAIS E MÉTODOS	170
IV. 2.1. Glúten	170
IV. 2.1.1. Preparação das amostras	170
IV. 2.2. Caracterização reológica dos sistemas de glúten	170
IV. 2.3. Caracterização por espectroscopia de RMN das amostras de glúten	171
IV. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	172
IV. 3.1. Caracterização reológica das amostras de glúten das variedades Amazonas e Sorraia	172
IV. 3.1.1. Identificação da zona de comportamento viscoelástico linear.....	172
IV. 3.1.2. Comparação das amostras de glúten das variedades Amazonas e Sorraia hidratadas à temperatura ambiente	174

IV. 3.1.3. Comparação das amostras de glúten das variedades Amazonas e Sorraia durante o tratamento térmico.....	178
IV. 3.1.4. Comparação do comportamento viscoelástico das amostras de glúten após o ciclo de aquecimento-arrefecimento.....	180
IV. 3.2. Caracterização das amostras de glúten por RMN de estado sólido	181
IV. 3.2.1. Caracterização por espectroscopia de ^{13}C -CP/MAS e ^{13}C -SPE	182
IV. 3.2.2. Caracterização por espectroscopia de ^1H	190
IV. 4. CONCLUSÕES.....	212

Capítulo V

Influência das pentosanas hidrossolúveis na propriedades viscoelásticas e espectroscópicas do glúten

V. 1. INTRODUÇÃO.....	217
V. 2. MATERIAIS E MÉTODOS	218
V. 2.1. Amostras	218
V. 2.2. Preparação das amostras	218
V. 2.2.1. Preparação das amostras para o estudo por reologia	218
V. 2.2.2. Preparação das amostras para o estudo por RMN.....	219
V. 2.3. Caracterização reológica	219
V. 2.4. Caracterização por espectroscopia de RMN	220
V. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	220
V. 3.1. Caracterização reológica das amostras de glúten + pentosanas hidrossolúveis	220
V. 3.1.1. Caracterização das amostras hidratadas à temperatura ambiente	220
V. 3.1.2. Caracterização das amostras durante aquecimento/arrefecimento	225
V. 3.1.3. Comportamento viscoelástico após aquecimento.....	231
V. 3.2. Caracterização por RMN do estado sólido	233
V. 3.2.1. Caracterização por ^1H -MAS	233
V. 3.3. Relação entre propriedades reológicas e propriedades espectroscópicas.....	243
V. 4. CONCLUSÕES.....	245

Capítulo VI

Influência das pentosanas hidrossolúveis na gelificação do amido

VI. 1. INTRODUÇÃO.....	249
VI. 2. MATERIAIS E MÉTODOS	252
VI. 2.1. Amostras de amido e de pentosanas hidrossolúveis	252
VI. 2.2. Preparação das amostras	252
VI. 2.3. Caracterização reológica dos sistemas de amido e amido com pentosanas hidrossolúveis.....	253
VI. 2.4. Caracterização dos sistemas por calorimetria diferencial de varrimento (DSC)	254
VI. 2.5. Caracterização dos sistemas de amido e amido com pentosanas hidrossolúveis por RMN de estado sólido	255
VI. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	256
VI. 3.1. Caracterização reológica das amostras de amido e amido com pentosanas hidrossolúveis.....	256
VI. 3.1.1. Identificação da zona de comportamento viscoelástico linear.....	256
VI. 3.1.2. Comparação das propriedades reológicas dos amidos das variedades Amazonas e Sorraia	258
VI. 3.1.3. Efeito das pentosanas hidrossolúveis no comportamento viscoelástico do amido.....	274
VI. 3.2. Efeito das pentosanas hidrossolúveis nas propriedades térmicas do amido ..	286
VI. 3.3. Caracterização das amostras de amido e amido com pentosanas hidrossolúveis por RMN de sólidos	290
VI. 3.3.1. Caracterização por espectroscopia de ¹³ C - CP/MAS	290
VI. 3.3.2. Caracterização por espectroscopia de ¹ H-MAS	296
VI. 4. CONCLUSÕES.....	313

Capítulo VII

Caracterização reológica e dinâmica de sistemas reconstituídos

VII. 1. INTRODUÇÃO.....	319
VII. 2. MATERIAIS E MÉTODOS	320
VII. 2.1. Amostras	320

VII. 2.1.1. Preparação das amostras para o estudo por reologia.....	321
VII. 2.1.2. Preparação das amostras para o estudo por RMN de sólidos	321
VII. 2.2. Caracterização reológica dos sistemas reconstituídos	322
VII. 2.3. Caracterização dos sistemas reconstituídos por RMN de sólidos	322
VII. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	323
VII. 3.1. Caracterização reológica	323
VII. 3.1.1. Caracterização reológica dos sistemas glúten + amido	323
VII. 3.1.2. Caracterização reológica dos sistemas glúten + amido + PHS	327
VII. 3.2. Caracterização dos sistemas reconstituídos por RMN de sólidos	337
VII. 3.2.1. Caracterização por espectroscopia de ¹³ C-CP/MAS	337
VII. 3.2.2. Caracterização por espectroscopia de ¹ H-MAS.....	340
VII. 3.2.3. Tempos de Relaxação T _{1H} e T _{2H}	348
VII. 4. CONCLUSÕES.....	357

Capítulo VIII

CONCLUSÕES FINAIS E TRABALHO FUTURO.....	363
---	------------

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA	371
---------------------------	------------

Prefácio

Os cereais ocupam um lugar muito importante nas culturas agrícolas, desde há milhões de anos. Na maior parte dos países, a porção das terras reservadas ao cultivo de cereais é a maior entre todas as plantas cultivadas. Grande parte dos cereais produzidos é usada para o consumo humano. O trigo é o cereal que apresenta maior destaque na alimentação humana, não só devido às suas propriedades nutricionais como também devido às suas propriedades funcionais. Dada a produção em grande escala de produtos derivados do trigo cada vez mais premente como forma de dar resposta às necessidades do consumidor, o desenvolvimento de novas variedades de trigo e o conhecimento fundamental da sua funcionalidade tornam-se bastante importantes, abrindo novas possibilidades para o cultivo e para a produção de trigos mais adaptados ao meio e mais adequados às suas aplicações.

A farinha do endosperma da semente de trigo é um sistema complexo, multicomponente, cuja estrutura e funcionalidade dependem de vários factores. Embora diversos trabalhos tenham sido previamente realizados acerca da influência de cada componente da farinha de trigo nas propriedades deste sistema, não se encontram descritos resultados concludentes, devido à complexidade do sistema e às abordagens efectuadas não terem sido sistemáticas e abrangentes quanto necessário.

O trabalho apresentado nesta tese surge na sequência de um estudo desenvolvido no âmbito do projecto “*Estudo Estrutural e Funcional de Sistemas Macromoleculares para a Compreensão das Propriedades da Farinha e do Endosperma do Trigo e seus Derivados*”, financiado pelo Subprograma Ciência e Tecnologia do 2º Quadro Comunitário de Apoio (PRAXIS/ PCNA/ BIO/ 0703/ 96). Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizadas duas variedades portuguesas de farinhas de trigo (*Triticum aestivum ssp. Vulgare*), desenvolvidas na *Estação Nacional de Melhoramento de Plantas* de Elvas (ENMP), e caracterizadas por possuírem propriedades tecnológicas distintas.

Com este trabalho pretende-se atingir dois objectivos principais:

- 1) Caracterização ao nível molecular da estrutura e dinâmica da farinha do endosperma de trigo e do glúten obtidos a partir de duas variedades portuguesas de

trigo; relação com o comportamento viscoelástico exibido por estas amostras em meio aquoso e relação com a caracterização tecnológica tradicional;

- 2) Compreender a influência na funcionalidade do amido e glúten de um dos componentes minoritários mais importantes da farinha de trigo: as pentosanas.

O trabalho realizado para se atingir o primeiro objectivo envolveu a aplicação e desenvolvimento de técnicas espectroscópicas de RMN de sólidos para o estudo de sistemas alimentares complexos de baixa mobilidade. A caracterização reológica (viscoelástica) das farinhas de trigo e do glúten envolveu, essencialmente, ensaios dinâmicos a baixa amplitude de deformação. Quer num, quer noutro caso, desenvolveu-se um estudo não destrutivo da farinha; algumas técnicas utilizadas neste trabalho foram aplicadas pela primeira vez a este tipo de estudo.

Para o estudo da influência das pentosanas sobre as propriedades dinâmicas e viscoelásticas dos dois componentes principais das farinhas do endosperma de trigo, o glúten e o amido, utilizaram-se técnicas sensíveis a diferentes níveis de organização das cadeias macromoleculares, nomeadamente técnicas espectroscópicas (RMN do estado sólido), de análise térmica (calorimetria de varrimento diferencial) e reológicas, com especial relevância para estas últimas.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE ASSUNTOS



I. 1. Farinha de seus componentes

I. 1.1. O Trigo

Proveniente da família das monocotiledóneas *Graminae*, tal como os demais cereais, o trigo pertence ao género *Triticum* do qual mais de trinta mil linhagens e variedades são conhecidas. Entre elas, apenas três são de maior importância do ponto de vista comercial: *Triticum aestivum* (*T. aestivum*), *T. durum* e *T. compactum*. A espécie *T. aestivum* é o trigo “comum” e o mais usado para o fabrico do pão. O *T. durum*, conhecido como trigo “duro”, é usado para o fabrico de massas alimentícias, e o *T. compactum*, conhecido como trigo “clube” é usado principalmente para confeitaria e produção de bolachas (Eliasson e Larsson, 1993). O trigo, devido à sua elevada resistência e capacidade de crescimento em variadas condições, é cultivado em quase todas as regiões aráveis, excepto nos trópicos. De acordo com as regiões em que são cultivados, são escolhidos diferentes tipos de trigo em função do seu rendimento e da sua adaptação ao clima e à altitude. Deste modo, existem os trigos de “Primavera” e os trigos de “Inverno” consoante sejam, respectivamente, plantados na Primavera para serem colhidos no Verão, ou plantados no Outono sendo colhidos na Primavera.

Englobando estes tipos de trigo, dois grupos principais distinguem-se pelas suas propriedades funcionais: os trigos “duros” e os trigos “moles”. Os trigos duros crescem em climas mais secos e áridos, e os trigos moles crescem em climas mais chuvosos e de mais regadio. Ambos apresentam capacidades diferentes para a panificação.

Estruturalmente, um grão de trigo tem cerca de 5-8 mm de comprimento, 2,5-4,5 mm de largura (Eliasson e Larsson, 1993) e é constituído, basicamente, por três partes: farelo, gérmen e endosperma. A Figura 1.1 apresenta os cortes longitudinal e transversal de um grão de trigo, evidenciando as diversas partes que o constituem. A parte mais exterior, a casca ou farelo, de cor ligeiramente acastanhada, é constituída por várias camadas, e constitui cerca de 14% do grão. No interior do grão situa-se o gérmen, ou embrião, contribuindo com cerca de 3% da massa total do grão. A restante parte, cerca de 83%, é constituída pelo endosperma que é o tecido de armazenamento de alimento para o desenvolvimento de uma nova planta. O endosperma, essencialmente constituído por

grânulos de amido e proteína, é a porção mais facilmente digerida e é a parte que é usada para produzir a farinha refinada. A farinha integral é constituída pelas três partes, sendo por isso uma farinha de elevado valor nutricional.

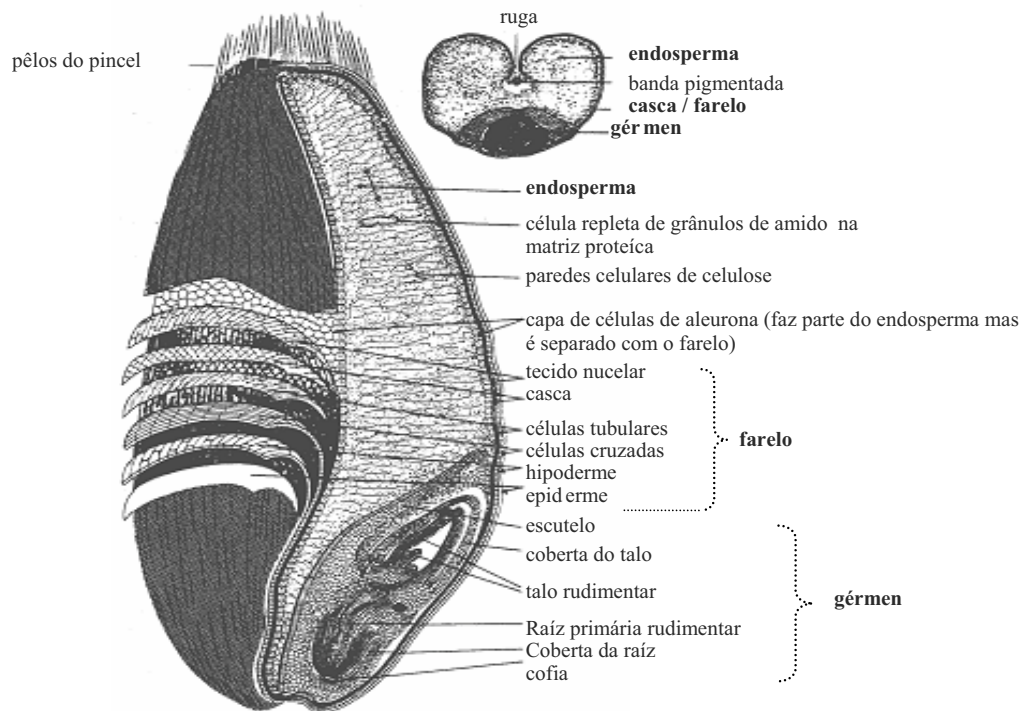


Figura 1.1 - Cortes longitudinal e transversal de um grão de trigo (adaptado de Hosenev, 1998)

I. 1.2. A Farinha de Trigo

A farinha de trigo é o produto resultante da moenda dos grãos de trigo, seguida do processo de refinação e separação do farelo (ou casca) e gérmen, do endosperma. De todos os cereais o trigo é o cereal mais adequado para o fabrico do pão não só devido ao seu agradável paladar mas essencialmente devido às propriedades físicas únicas das suas proteínas (Shewry e Tatham, 1987; Hosenev e Rogers, 1990; Amemiya e Menjivar, 1992; Lásztity, 1996). Estas, quando hidratadas, produzem uma massa com uma elasticidade capaz de reter o gás formado durante a fermentação, conferindo ao pão um certo volume e uma textura fofa, consequência da dispersão de bolhas de ar imobilizadas na matriz de amido gelificado e rede proteica. As farinhas dos outros cereais produzem pães mais

pesados, com menor volume e com uma textura mais compacta e mais granulosa (Moss, 1972).

A composição química da farinha de trigo depende não só da composição total dos grãos de trigo a partir dos quais foi produzida, mas também do grau de extracção durante o processo de moagem. A composição química dos grãos de trigo varia de acordo com a variedade do trigo (por exemplo, umas variedades têm mais tendência para níveis mais elevados de proteína do que outras), com o clima (p.ex., trigos de Inverno apresentam uma composição diferente dos trigos de Primavera), com a composição do solo em que foram cultivados (p.ex., grãos de trigo provenientes de solos ricos em azoto apresentam teores mais elevados de proteína) e com as condições de colheita, as quais influenciam, nomeadamente, os níveis de actividade enzimática. A composição química do grão de trigo varia entre as suas diferentes partes fisiológicas (Tabela 1.1), encontrando-se também gradientes de composição no interior do endosperma (Hawthorn, 1981; Eliasson e Larsson, 1993). Com o processo de moagem, porém, este gradiente de composição desaparece uma vez que os componentes são redistribuídos durante a fase de mistura e homogeneização da farinha.

Tabela 1.1 - Composição química^a de diferentes partes fisiológicas do grão de trigo

Componente	Grão inteiro	Endosperma	Gérmen	Aleurona	Farelo
Proteína (%)	8,2-12,1	5,8-16,2	24,3-31,1	18,4-24,3	2,85-7,60
Cinzas (%)	1.8	0.5-0.8	3.65-9.47	11.1-17.2	1.7-5.1
Fibras (%)	9.0	1.4	8.6	43.0	17.1-73.3
Lípidos (%)	1.8	1.6-2.2	5.05-18.8	6.0-9.89	0.0-1.03
Amido (%)	59.2	63.4-72.6	0.0	0.0	0.0

^a - adaptado de Eliasson e Larsson, 1993; valores apresentados com base em matéria seca.

O processo de refinação da farinha contribui para a conservação da farinha, uma vez que o gérmen é separado do endosperma, mas o seu valor nutritivo diminui. Grande parte das vitaminas que se encontram na casca e no gérmen dos grãos de trigo é perdida. O gérmen, rico em lípidos, é removido por contribuir para o aparecimento do aspecto e do paladar

rançoso da farinha (Bushuk, 1998). A tabela 1.2 apresenta a composição média de farinhas de trigo em função do grau de extracção.

Tabela 1.2 - Composição química^a de farinhas de trigo em função com o grau de extracção

Componente	100%	80%	70%	42-46%
Proteína (%) ^a	9,0 - 14	8,3 - 13	8,0 - 12	7,7 - 12
Cinzas (%) ^a	1.5 - 1.6	0.59 - 0.71	0.41 - 0.43	0.34 - 0.37
Fibras (%) ^a	2.0 - 2.2	0.13 - 0.20	vestígios	vestígios
Lípidos (%) ^a	2.0 - 2.5	1.3 - 1.5	1.1 - 1.2	0.765 - 0.87
Amido (%) ^a	64-68	70-74	71-75	72-77
Vit. B1 (µg/g) ^b	3.5	2.0	0.7	0.3
Riboflavina (µg/g) ^b	1.7	0.8	0.7	0.5
Cálcio (µg/g) ^b	27.6	15.4	12.8	11.1

^a - adaptado de Eliasson e Larsson, 1993; valores apresentados com base em matéria seca.

^b - adaptado de Hawthorn, 1981; valores apresentados com base em matéria seca.

Nesta secção será dada especial atenção à composição química do endosperma, já que a farinha de trigo usada em panificação é essencialmente constituída pelo produto resultante da sua moagem.

I. 1.3. Componentes Principais da Farinha de Trigo

I. 1.3.1. Amido

I. 1.3.1.1. Composição e organização molecular

O amido é o principal constituinte das farinhas de trigo representando cerca de 70% da sua massa seca. É sintetizado no endosperma dos grãos de trigo, em células específicas denominadas por *amiloplastos*, e armazenado sob a forma de grânulos. A forma e o tamanho dos grânulos de amido varia de acordo com a origem botânica, sendo esta diferença perfeitamente visível ao microscópio óptico.

Os grânulos de amido são relativamente densos e rígidos, insolúveis e hidratam-se ligeiramente na presença de água à temperatura ambiente. À semelhança dos amidos de centeio e de cevada, o amido de trigo apresenta uma distribuição de tamanhos de grânulos bimodal, numa gama de 1-30 μm , sendo constituído por dois tipos de grânulos: os grânulos do tipo A e os grânulos do tipo B. Os grânulos do tipo A são os maiores, com um diâmetro superior a 10 μm (média 15 μm), com uma forma biconvexa ou lenticular e representam cerca de 70% do volume total de grânulos de amido. Os grânulos do tipo B são os mais pequenos, com diâmetros inferiores a 10 μm (média 4 μm) e uma forma esférica. Ocupam cerca de 30 % do volume total de grânulos, mas representam cerca de 90% em número total de grânulos (Eliasson e Larsson, 1993; Evers *et al.*, 1999; Rahman *et al.*, 2000).

Os grânulos de amido de trigo são constituídos quase inteiramente por uma mistura de dois polímeros de glucose com propriedades distintas: a amilose e a amilopectina. Estes dois polímeros diferem no grau de polimerização (GP) e no grau de ramificação, diferenças estas que se reflectem nas propriedades funcionais e aplicações industriais do amido.

A amilose é um polímero essencialmente linear com ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ entre resíduos de α -D-glucopirranose (Figura 1.2), embora vestígios de ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ possam também existir mas constituindo apenas cerca de 0.3-0.5% do total das ligações (Whistler e BeMiller, 1997). A amilose tem um GP na ordem de 10^3 - 10^4 . As poucas cadeias laterais existentes são geralmente muito curtas ou muito longas.

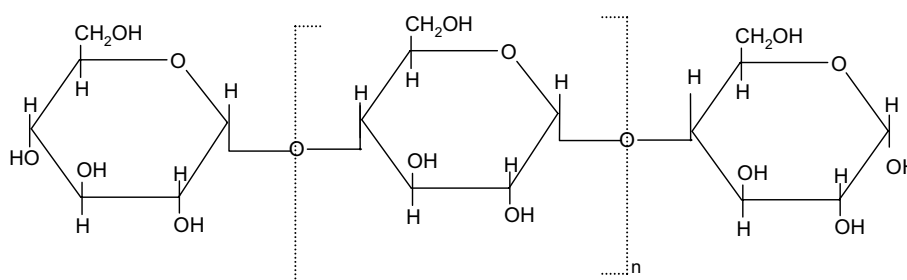


Figura 1.2 - Estrutura básica da amilose; n, número de unidades de resíduo de D-glucose

Quando em solução, as moléculas de amilose podem adoptar uma conformação helicoidal e podem associar-se com ácidos orgânicos, álcoois e lípidos, formando complexos em que

os ligandos ocupam o centro (ou cavidade) da hélice (figura 1.3). A ligação de iões triiodeto no interior da hélice, por exemplo, é responsável pela coloração azul desenvolvida pela solução de iodo ou de peróxido de iodo na presença de amido, devido à presença de amilose (Evers *et al.*, 1999; Eliasson e Larsson, 1993).

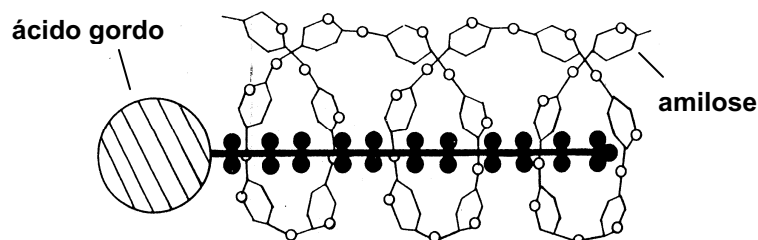


Figura 1.3 - Representação da estrutura helicoidal da amilose complexada com um ácido gordo (adaptado de Hosene, 1998)

A amilose tem a capacidade de se associar consigo mesma, formando ligações de hidrogénio intramoleculares, o que lhe confere a capacidade para cristalizar, num processo conhecido como retrogradação que será apresentado mais detalhadamente na secção I.1.3.1.3.

A amilopectina é uma molécula bastante maior do que a molécula da amilose. Apresentando um GP de 10^5 a 10^7 , a amilopectina é uma das maiores moléculas encontradas na natureza (Evers *et al.*, 1999; Eliasson e Larsson, 1993). É também constituída por unidades α -D-glucopiranosil ligadas entre si por ligações glicosídicas $\alpha(1 \rightarrow 4)$, mas apresenta uma estrutura mais ramificada que a amilose (Figura 1.4). As ligações $\alpha(1 \rightarrow 6)$ que se encontram nos pontos de ramificação constituem cerca 4-5% do total das ligações glicosídicas (Evers *et al.*, 1999; Whistler e BeMiller, 1997).

O comprimento das cadeias laterais da amilopectina varia entre 17 a 26 unidades, distinguindo-se 3 tipos de cadeias: cadeias do tipo A, compostas apenas por ligações $\alpha(1 \rightarrow 4)$, cadeias do tipo B compostas por ligações $\alpha(1 \rightarrow 4)$ e $\alpha(1 \rightarrow 6)$, e cadeias do tipo C, compostas por ligações $\alpha(1 \rightarrow 4)$ e $\alpha(1 \rightarrow 6)$, possuindo o único grupo redutor (C-1 não

ligado) na sua extremidade. Estes três tipos de cadeias dispõem-se em forma de cacho, como é ilustrado na figura 1.5.

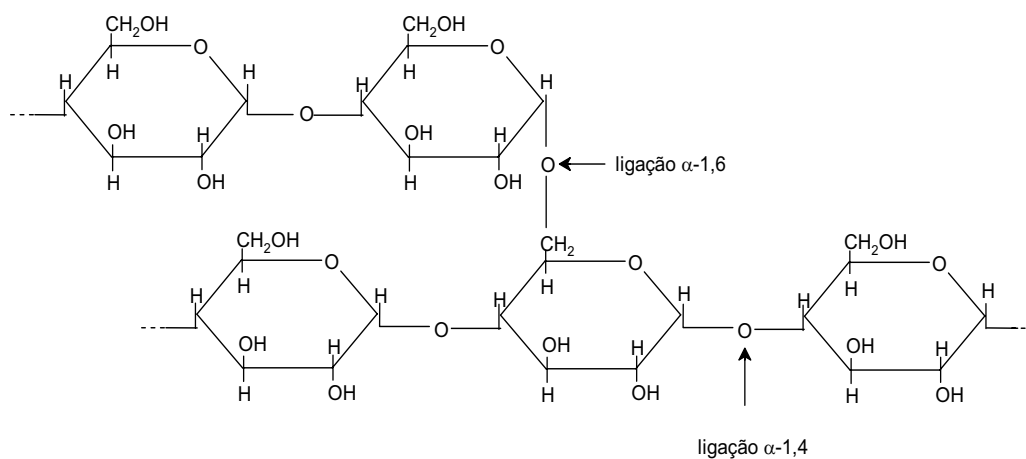


Figura 1.4- Estrutura básica da amilopectina

As moléculas de amilopectina não formam complexos tão facilmente como a amilose, embora algumas cadeias laterais da amilopectina apresentem também uma conformação helicoidal apresentando a inclusão de lípidos.

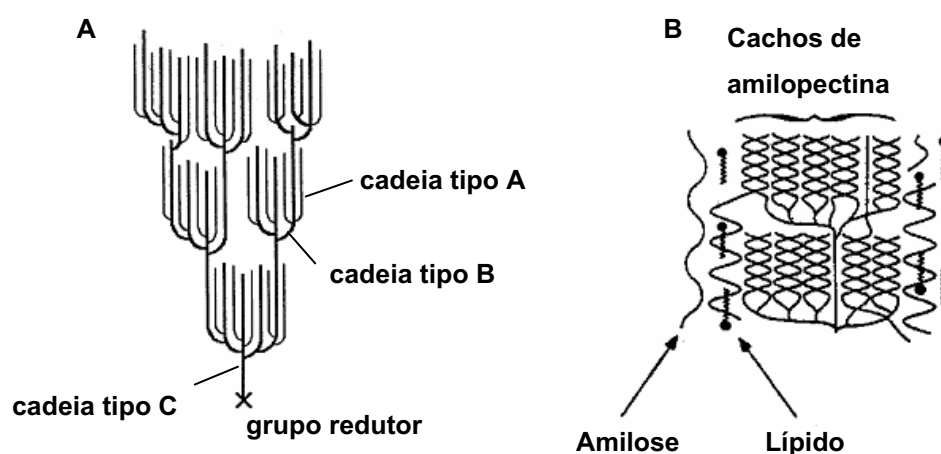


Figura 1.5 - A- Estrutura em cacho das moléculas de amilopectina (adaptado de Eliasson e Larsson, 1993); B- estrutura helicoidal das moléculas de amilopectina dispostas em cacho; algumas moléculas laterais podem formar complexos com lípidos (adaptado de Gallant *et al*, 1997)

I. 1.3.1.2. Birefringência e Cristalinidade do Amido

Quando vistos à luz polarizada, os grânulos de amido exibem birefringência, mostrando as características cruzeiros de malta (Figura 1.6), indicando que as moléculas no interior do grânulo estão organizadas segundo uma direção radial.

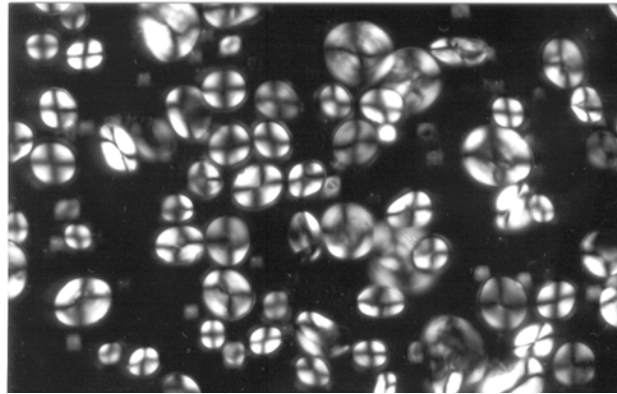


Figura 1.6 - Fotomicrografia de grânulos de amido hidratados visto ao microscópio óptico com polarização cruzada, mostrando as cruzeiros de malta

Os grânulos de amido completos (maturos) apresentam uma estrutura em lamelas, contendo regiões cristalinas e regiões não-cristalinas dispostas em camadas alternadas (Figura 1.7). As regiões cristalinas são constituídas por moléculas de amilopectina dispostas em hélices duplas, com os grupos redutores virados para o centro do grânulo, conhecido como hilum. As moléculas de amilose dispõem-se entre as moléculas de amilopectina e não contribuem para a cristalinidade. Grânulos de amido de trigo intactos exibem um padrão de raios-X do tipo A dada a disposição das cadeias de amilopectina. Na presença de inclusões na molécula de amilose os grânulos de amido exibem um padrão do tipo V (Gidley e Bociek, 1985; Zobel e Stephen, 1995). A cristalinidade e a birefringência podem ser destruídas por danificação mecânica dos grânulos, ou pelo processo de gelatinização do amido.

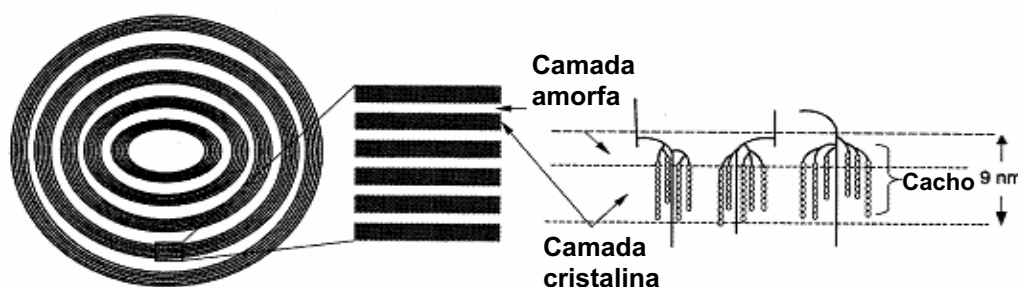


Figura 1.7 - Representação da estrutura em lamelas de um grânulo de amido (adaptado de Tester *et al.*, 2004)

I. 1.3.1.3. Gelatinização e Retrogradação

Quando o amido é colocado em contacto com a água, os grânulos de amido começam a absorver a água, aumentando em cerca de 30% da sua massa seca, e cerca de 5% do seu volume inicial (Hoseney, 1994). À temperatura ambiente este processo de hidratação é reversível. Porém, quando uma dispersão de amido em água é submetida a um aquecimento, é atingida uma temperatura crítica a partir da qual o amido sofre alterações irreversíveis. Esta temperatura crítica denomina-se por *temperatura de gelatinização* e todo o conjunto de alterações sofridas pelo amido, durante o aquecimento, é conhecido por gelatinização. A temperatura de gelatinização corresponde ao ponto a partir do qual os grânulos de amido começam a aumentar significativamente de volume, por hidratação e devido a uma subida da temperatura, aumentando a viscosidade do sistema, observando-se ainda a perda da birrefringência e cristalinidade dos grânulos de amido. Durante o aquecimento, alguns constituintes internos dos grânulos de amido, principalmente amilose, são lixiviados para o exterior, contribuindo também para o aumento observado da viscosidade. O produto final da gelatinização denomina-se por gel, sendo este um sistema com propriedades viscoelásticas, formado por uma rede de cadeias de amilose/amilopectina às quais estão ligadas camadas de água por pontes de hidrogénio.

À medida que um gel de amido arrefece, as cadeias de amilose/amilopectina tornam-se menos móveis, as ligações de hidrogénio ficam mais fortes e o gel fica mais rígido. Num arrefecimento mais prolongado e mais acentuado, as cadeias de amido (principalmente as

de amilose) têm uma forte tendência para interagirem umas com as outras, forçando a água para fora do sistema. A este processo dá-se o nome de sinérese. Num armazenamento mais prolongado, as interações entre as cadeias são cada vez mais fortes podendo eventualmente formarem-se cristais. O processo de cristalização das cadeias de amido com a formação de um gel mais opaco e mais rígido é denominado por *retrogradação*. A taxa de retrogradação depende de vários factores tais como a razão amilose/amilopectina, temperatura, concentração de amido, origem botânica e presença de outros ingredientes (Jacobson *et al.*, 1997). A retrogradação envolve quer a amilose quer a amilopectina. Contudo, a taxa de retrogradação é muito maior para a amilose do que para a amilopectina, pelo que a amilose é a principal responsável pelas alterações que ocorrem a curto prazo, enquanto que a amilopectina tem um papel mais importante nas alterações que ocorrem a longo prazo (Conde-Petit e Escher, 1994)

I. 1.3.1.4. Importância do amido na panificação

No processo de panificação, o amido desempenha um papel bastante importante, actuando como um material estruturante. No entanto, o amido proveniente de diferentes origens apresenta qualidades diferentes para a panificação e apenas o amido de trigo possui a capacidade para formar pães com uma boa qualidade de textura e volume (Harris, 1942; Sandstedt *et al.*, 1961; Hosney *et al.*, 1971; Kulp *et al.*, 1991).

Sendo constituído por unidades de glucose, o amido serve como fonte de açúcar para a fermentação pela levedura, contribuindo para a formação de gás e etanol, contribuindo para o paladar e o aroma característicos do pão. O amido danificado apresenta também um papel benéfico na panificação, uma vez que é susceptível à degradação pelas amilases, suportando o processo de fermentação à temperatura ambiente.

Numa de massa pão, o amido actua como uma matriz de dispersão do glúten, “diluindo” o glúten a uma consistência própria. O amido absorve a água mais rapidamente do que o glúten, controlando assim a quantidade de água absorvida pelo glúten. Durante o processo de mistura da massa, os grânulos de amido ficam aprisionados na rede de glúten, actuando como um recheio da matriz proteica, oferecendo uma boa superfície de ligação com o glúten. A distribuição de tamanhos de grânulos apresenta aqui um papel bastante importante. Os grânulos de amido mais pequenos possuem a capacidade de se encaixarem

mais facilmente na rede de glúten. Uma maior quantidade de grânulos de amido mais pequenos aumenta a capacidade de absorção de água da farinha, aumentando assim a viscosidade da massa.

Durante o cozimento do pão, os grânulos de amido aumentam de volume, tornando-se mais flexíveis, permitindo uma maior extensibilidade das células de gás formadas durante a fermentação. Devido à hidratação dos grânulos de amido durante o cozimento, o amido remove a água existente na rede de glúten, levando a que a massa de pão se torne mais firme e mais rígida (Hoseney *et al.*, 1971). Durante a gelatinização do amido, a libertação de moléculas de amilose e subsequente quebra de estrutura de alguns grânulos contribui para o progresso do processo de fermentação, e, por conseguinte, para o aumento do volume do pão.

Durante o arrefecimento, as moléculas de amilose e amilopectina lixiviadas durante a gelatinização levam à formação de um gel, contribuindo para a estabilização da estrutura final. Alguns grânulos de amido que não foram destruídos durante o processo de aquecimento permanecem na matriz do glúten, contribuindo para a maciez do miolo do pão. As alterações na organização estrutural das fracções do amido, nomeadamente a ocorrência de re-cristalização (retrogradação), contribuem para a formação da crosta estaladiça do pão e é a principal causa do envelhecimento (endurecimento) do pão.

I. 1.3.2. Proteínas

As proteínas são o segundo maior componente das farinhas de trigo, representando cerca de 8-20% da sua massa seca. Osborne (1907) classificou as proteínas dos cereais segundo a sua solubilidade em vários solventes, agrupando-as em quatro grupos principais. Mais tarde, Chen e Bushuk (1970) introduziram mais um grupo, baseado no conceito de que outras subclasses de proteínas poderiam ser separadas por processos mais selectivos. Assim, as proteínas do trigo podem ser classificadas como albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em soluções salinas), prolaminas (solúveis em soluções de álcoois), glutelinas (solúveis em soluções ácidas) e resíduo (solúveis em soluções alcalinas ou pela acção de agentes redutores).

Nutricionalmente, as albuminas e as globulinas têm uma composição em aminoácidos bastante equilibrada. São ricas em lisina, triptofano e metionina, três aminoácidos

geralmente presentes em poucas quantidades nos cereais (Hoseney, 1986). A composição em aminoácidos das glutelinas é semelhante à das prolaminas, sendo ricas em prolina, arginina, asparagina e glutamina, e pobres em lisina, triptofano e metionina (Eliasson e Larsson, 1993).

I. 1.3.2.1. Proteínas solúveis em água

As albuminas e as globulinas encontram-se no endosperma, no gérmen e nas camadas aleuronais da casca e são consideradas proteínas hidrossolúveis. Elas englobam essencialmente proteínas com actividade biológica funcional (enzimas metabolicamente activas), como por exemplo, α - e β -amilases, proteases, lipases, pululanases, lipoxigenases, fitases, fenoloxidasas e peroxidases (Bietz, 1979; Bushuk, 1985; Hargreaves *et al.*, 1995a; Lászitity, 1996; Evers *et al.*, 1999; Eliasson e Larson 1993, Hoseney, 1998). Constituem cerca de 10-20% do teor total de proteínas e possuem massas moleculares inferiores a 30000 Da. São facilmente extraídas da farinha de trigo uma vez que, por serem solúveis em água, permanecem na fase aquosa juntamente com outros compostos hidrossolúveis tais como as pentosanas e glicoproteínas.

I. 1.3.2.2. Proteínas insolúveis em água

As prolaminas e as glutelinas englobam duas classes de proteínas consideradas ambas insolúveis em água, que constituem o conjunto de proteínas de trigo conhecido como glúten, e que conferem ao trigo as suas propriedades únicas entre os demais cereais. A insolubilidade do glúten deve-se à sua elevada concentração em resíduos não polares (tais como a prolina e leucina), à sua composição em resíduos polares mas não ionizáveis de glutamina, e à sua baixa concentração de aminoácidos com cadeias laterais ionizáveis tais como lisina, arginina, glutamina e asparagina (Fennema, 1996).

As prolaminas sempre foram consideradas exclusivas das sementes dos cereais, tendo recebido nomes diferentes para cereais diferentes: gliadinas no trigo, aveninas na aveia, zeínas no milho, secalinas no centeio e hordeínas na cevada. No trigo as glutelinas denominam-se por gluteninas (Shewry, 1995). Para além de serem proteínas de reserva, as proteínas do glúten são também proteínas funcionais. Não possuem actividade enzimática

mas são as únicas a formar uma massa forte e coesa capaz de reter o gás formado durante a fermentação, conferindo uma estrutura mais leve ao pão. As proteínas do glúten foram das primeiras proteínas a serem estudadas com o trabalho pioneiro de Beccari, em 1745.

As proteínas de reserva são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso sendo depois armazenadas nas células da camada aleuronal e no endosperma do grão de trigo (Shewry, 1995; Richard *et al.*, 1996). Uma vez sintetizadas em grandes quantidades, são armazenadas de uma forma concentrada em compartimentos subcelulares de modo a estarem separadas de outros processos metabólicos.

Uma classificação mais recente, proposta por Shewry *et al* (1986), inclui as gliadinas e as gluteninas no grupo das prolaminas por serem ricas nos aminoácidos prolina e glutamina. As prolaminas são ainda divididas em três subgrupos, de acordo com a sua estrutura e a sua herança genética em termos do teor em enxofre (Figura 1.8): prolaminas ricas em enxofre, prolaminas pobres em enxofre, e prolaminas de elevada massa molecular. A seguir faz-se uma descrição mais detalhada das gliadinas e das gluteninas.

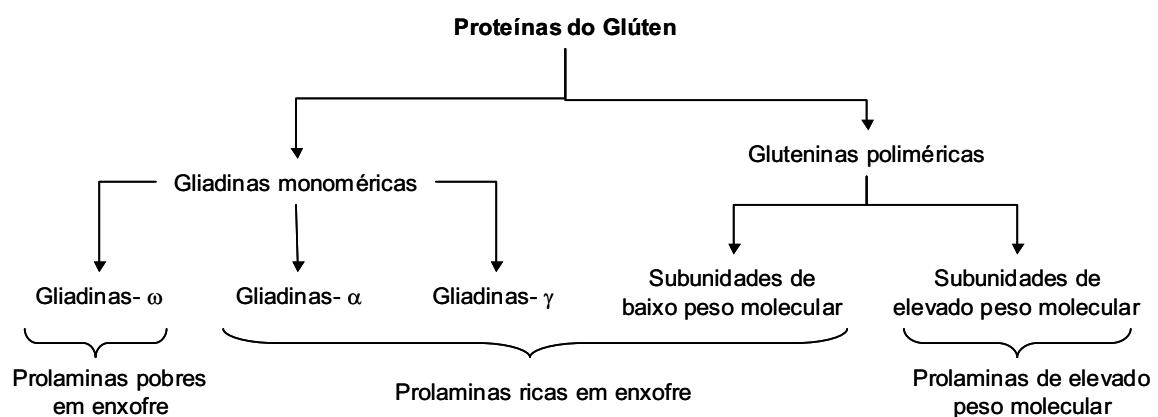


Figura 1.8 - Subdivisão das prolaminas segundo Shewry *et al.* (1986)

As gliadinas constituem cerca de 30-35% do total de proteínas presentes na farinha de trigo. São geralmente divididas de acordo com a sua mobilidade electroforética, a baixo pH, em quatro grupos (Bietz e Wall, 1980; Woychick *et al.*, 1961): gliadinas -α (maior mobilidade), -β, -γ e -ω (menor mobilidade). Devido ao diferente conteúdo em cisteína, as gliadinas podem ainda ser subdivididas em gliadinas ricas em enxofre (gliadinas-α, -β e -γ)

e em gliadinas pobres em enxofre (gliadinas- ω) (Figura 1.8). De um modo geral as gliadinas são bastante ricas em prolina e glutamina, e pobres em aminoácidos básicos, especialmente em lisina o que confere a esta um déficit nutricional. As gliadinas- ω são muito pobres em cisteína e metionina, contendo poucos ou nenhuns aminoácidos com enxofre, mas contêm níveis relativamente elevados de fenilalanina, para além do elevado conteúdo em prolina e glutamina. Todas as gliadinas são monómeros sem ligações dissulfeto (gliadinas- ω) ou com ligações dissulfeto entre aminoácidos da mesma cadeia (gliadinas- α , β , e γ). As gliadinas- ω possuem a massa molecular entre 60000 e 80000 Da. As gliadinas- α , β , e γ são mais pequenas, situando-se entre os 30000 e 40000 Da (Bietz e Wall, 1980; Tatham e Shewry, 1995).

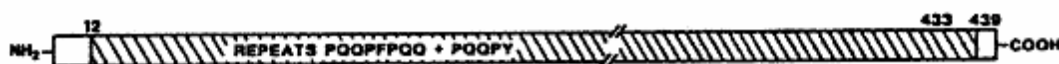
As gluteninas constituem cerca de 40-50% das proteínas da farinha de trigo. São constituídas por subunidades que formam grandes polímeros estabilizados por ligações dissulfeto intra e intermoleculares (Field *et al.*, 1983), com massas moleculares entre 11600 e 133000 Da. Após redução e alquilação, as gluteninas podem ser separadas em unidades de elevada massa molecular (HMW) e unidades de baixa massa molecular (LMW) de acordo com a solubilidade em 70% etanol neutro (Bietz e Wall, 1980). De acordo com a sua mobilidade electroforética, as gluteninas podem ainda ser divididas em quatro subgrupos diferentes (A, B, C e D). O subgrupo A, com massas moleculares entre 80000 e 120000 Da, corresponde às unidades HMW. Os subgrupos B (42000-51000 Da), C (30000-40000 Da) e D (11000-30000 Da) correspondem às unidades LMW. As unidades LMW B e C são muito semelhantes às gliadinas- α e γ na sua composição em aminoácidos e massas moleculares, enquanto que as unidades D se assemelham às gliadinas- ω (Payne e Corfield, 1979; Payne *et al.*, 1985 ; Jackson *et al.*, 1983, Masci *et al.*, 1993). As unidades HMW contêm menos prolina, são ricas em glicina e glutamina (Belitz *et al.*, 1986), possuem massa molecular entre 80000 e 133000 e são insolúveis em 70% etanol. A razão da sua insolubilidade deve-se à sua elevada massa molecular.

As gluteninas LMW representam cerca de 60% do teor total das gluteninas. Apesar da sua abundância, estas proteínas não têm sido tão extensivamente estudadas como as gluteninas HMW devido, sobretudo, à dificuldade de isolamento e identificação, uma vez que estas proteínas se encontram sobrepostas com as gliadinas (Bietz e Wall, 1975; Bushuk, 1985). Este problema foi resolvido pelo desenvolvimento de novas técnicas de electroforese em

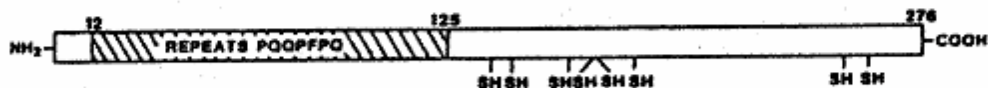
SDS-PAGE tornando assim possível o isolamento das gluteninas LMW (Jackson *et al.*, 1983; Singh e Shepherd, 1988; Singh *et al.*, 1991; Gupta e MacRitchie, 1991).

A estrutura das gliadinas e das gluteninas tem sido determinada através de vários métodos preditivos, cromatográficos e espectroscópicos, tais como a espectroscopia de infravermelho (FT-IR), a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), a espectroscopia de dicroísmo circular (CD) e a cromatografia por permeação em gel. As sequências de aminoácidos estão divididas em diferentes domínios de tamanho variável (Figura 1.9), uma característica comum a todas as prolaminas. A porção N-terminal poderá ou não conter domínios repetitivos, dependendo do tipo de proteína. Segue-se depois o domínio central caracterizado por unidades de sequências de aminoácidos que constituem domínios repetitivos de polipeptídeos, característicos de cada tipo de proteínas. A sequência de aminoácidos termina com a porção C-terminal que contém os domínios não repetitivos, onde estão localizados a maioria dos resíduos de cisteína. As conformações das moléculas de gliadina são estabilizadas por pontes de hidrogénio e por interações hidrofóbicas. Na sua estrutura, as gliadinas- α e - β contêm 6 resíduos de cisteína e as gliadinas- γ contêm 8. Não existem resíduos de cisteína livres, encontrando-se todos envolvidos na formação de ligações dissulfeto intramoleculares (3 ligações S-S nas gliadinas- α e - β , e 4 ligações S-S nas gliadinas- γ) evitando assim que as gliadinas participem na estrutura polimérica das gluteninas. Embora as gliadinas- α , - β , e - γ apresentem uma estrutura secundária semelhante, as gliadinas- α e - β , parecem ter uma estrutura globular compacta, enquanto que as gliadinas- γ parecem ter uma estrutura mais extendida (menos globular) (Lásztity, 1996). A estrutura do domínio central repetitivo é caracterizado pela existência de dobras- β , sendo a sua distribuição irregular nas gliadinas- α e - β mas bastante regular nas gliadinas- γ , conferindo-lhes uma estrutura mais extendida, em forma de espiral. O domínio não repetitivo é rico em hélices- α e folhas- β . As gliadinas- ω parecem ter uma estrutura tipo bastão, apresentando uma estrutura secundária não compacta. A conservada estrutura repetitiva das gliadinas- ω parece ser o factor principal responsável pela estrutura destas proteínas. As dobras beta são bastante comuns nesta estrutura, tendo também sido observadas algumas estruturas em folha- β e α -hélices, formando uma espiral relativamente aberta (Tatham e Shewry, 1985; Tatham *et al.*, 1990; Popineau e Pineau, 1988).

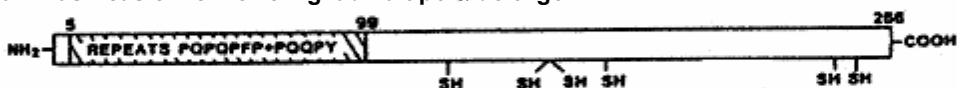
Prolaminas pobres em enxofre – gliadina tipo ω (hordeína C) do centeio



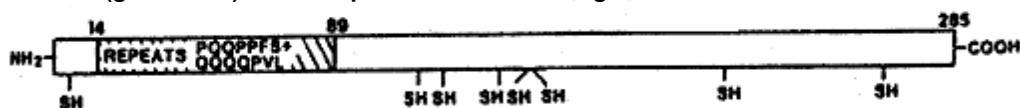
Prolaminas ricas em enxofre – gliadina tipo γ do trigo



Prolaminas ricas em enxofre – gliadina tipo α do trigo



Prolaminas (gluteninas) de baixo peso molecular do trigo



Prolaminas (gluteninas) de elevado peso molecular do trigo – subunidade 1By9



Figura 1.9 - Representação esquemática da estrutura das prolaminas, ilustrando a presença dos domínios N-terminal, central e C-terminal (adaptado de Tatham *et al.*, 1990)

A estrutura secundária dos grupos B e C das gluteninas de baixa massa molecular parece ser bastante semelhante à estrutura das gliadinas- α e γ , enquanto que a estrutura das gluteninas do grupo D se assemelha bastante à das gliadinas- ω (Tatham *et al.*, 1987; D'Ovidio *et al.*, 1995; Masci *et al.*, 1991a,b, 1993; Shewry e Tatham, 1997; Lafiandra *et al.*, 2000). O domínio central repetitivo apresenta uma grande quantidade de dobras- β , possivelmente formando uma estrutura em espiral, enquanto que os domínios não repetitivos apresentam uma estrutura em hélice- α apresentando-se mais compacta. Estas proteínas apresentam um resíduo de cisteína no terminal-N que, devido à rigidez da cadeia polipeptídica imposta pela sequência repetitiva do domínio central, não forma ligações intramoleculares com as cisteínas do C-terminal. O C-terminal, por sua vez, contém sete resíduos de cisteína, dos quais um fica livre para ligações intermoleculares (Tao e Kasarda, 1989; Thomson *et al.*, 1992; Shewry *et al.*, 1995; D'Ovidio *et al.*, 1997).

Na sua estrutura primária, as gluteninas HMW possuem um domínio central hidrofóbico e repetitivo. Os domínios N- e C-terminais apresentam um carácter hidrofílico e constituem, provavelmente, a base molecular do papel das unidades de elevada massa molecular na funcionalidade do glúten (Gianibelli *et al.*, 2001). Os resíduos de cisteína estão todos localizados nos domínios N- e C- terminais, ou perto destes, num número entre quatro e seis resíduos, dependendo do tipo de sub-unidade. Pouco se sabe ainda sobre o modo como os resíduos de cisteína se combinam para formar as ligações dissulfeto intra- e intermoleculares (Belton *et al.*, 1999).

Vários modelos têm sido propostos para a estrutura das unidades HMW das gluteninas. O modelos mais antigos, propostos por Ewart (1968) e Lásztity (1972), descreviam que as cadeias polipeptídicas eram lineares e estavam ligadas entre si apenas por uma ligação dissulfeto. Em 1976, Kasarda *et al.* propôs um modelo alternativo no qual não existiriam ligações intermoleculares, sendo todas as ligações dissulfeto do tipo intramolecular. Segundo este modelo, as ligações intramoleculares forçariam as gluteninas a adoptar conformações específicas que facilitariam a interacção com outras moléculas de glutenina adjacentes através de ligações não covalentes, tais como pontes de hidrogénio, ligações iónicas e interacções hidrofóbicas, levando assim à agregação das moléculas. Estudos mais recentes (Tatham *et al.*, 1985b; Field *et al.*, 1987; Purcell *et al.*, 1988; Miles *et al.*, 1991; Shewry *et al.*, 1992, 1997), indicam que ambos os domínios terminais apresentam uma estrutura globular em hélice- α . O domínio central de sequências repetitivas parece ter uma estrutura tipo bastão formada por dobras- β sobrepostas formando uma estrutura helíptica, a espiral- β . Por analogia à estrutura da proteína do tecido conjuntivo da elastina, Tatham *et al.* (1985b) propuseram que as dobras- β confeririam às gluteninas de elevada massa molecular as suas distintas propriedades elásticas, modelo que foi refutado por Belton *et al.* (1994) que referiram que as gluteninas diferiam da elastina na sua interacção com a água. A elasticidade das gluteninas parece estar relacionada com o elevado conteúdo de resíduos de glutamina, os quais apresentam uma elevada capacidade para formarem pontes de hidrogénio intra e intermoleculares (Belton, 1999).

I. 1.3.2.3. Importância das proteínas na panificação

As gliadinas e as gluteninas são as principais responsáveis pelas propriedades reológicas e funcionais das farinhas de trigo, e por fazerem do trigo o cereal mais usado no mundo. Devido à presença destas proteínas na farinha de trigo, esta, quando hidratada, tem a capacidade de formar uma rede viscoelástica capaz de reter o gás formado durante a fermentação do pão, conferindo um maior volume e uma estrutura mais fina ao pão. Os outros constituintes da farinha e ingredientes adicionados são também responsáveis pelas propriedades funcionais da massa e propriedades organolépticas de um pão de qualidade. Porém, esta qualidade não é atingida se a farinha usada não tiver na sua constituição proteínas em quantidade e qualidade suficientes (Bushuk, 1997; Uthayakumaran *et al.*, 1999 ; Lásztity *et al.*, 2000). A quantidade é necessária para a formação de uma matriz contínua de massa e depende de vários factores externos como o teor de azoto e humidade do solo e temperatura ambiente em que os grãos de trigo foram cultivados. A qualidade é um factor determinado geneticamente e depende do tipo e estrutura das proteínas constituintes. A razão entre composição de gluteninas e gliadinas parece ser importante para a definição das propriedades reológicas das massas de pão (Graveland *et al.*, 1982; Belitz *et al.*, 1986; MacRitchie, 1980; MacRitchie, 1987; Cornec *et al.*, 1994; Khatkar *et al.*, 1995; Janssen *et al.*, 1996a; Sapirstein e Fu 2000). Uma maior concentração de gluteninas está relacionada com uma maior elasticidade e maior resistência à deformação. As gluteninas, pelo estabelecimento de pontes de dissulfeto são responsáveis pelo carácter elástico do glúten e da massa. As gliadinas, por sua vez, embora não participem na formação de redes elásticas como as gluteninas, actuam como plasticizantes, por interacções hidrofóbicas e pontes de hidrogénio, promovendo o carácter viscoso e a extensibilidade bastante importantes para o manuseamento e comportamento reológico da massa de pão. Vários estudos têm revelado que as unidades de elevada massa molecular (gluteninas HMW) são bastante importantes na formação de uma rede forte de glúten (Payne *et al.*, 1987; Popineau *et al.*, 1994a; Belton, 1999; Bekkers *et al.*, 2000; Edwards *et al.*, 2001), devido ao seu elevado teor em prolina e formação de uma estrutura pragueada. As unidades de baixa massa molecular parecem ter um efeito adverso no comportamento reológico das massas (MacRitchie, 1987).

I. 1.3.3. Constituintes menores

I. 1.3.3.1. Pentosanas

I. 1.3.3.1.1. Estrutura e composição

As pentosanas são polímeros de pentoses constituintes das paredes celulares dos grãos de trigo. As pentosanas são vulgarmente denominadas por arabinoxilanas por serem constituídas essencialmente por moléculas de xilose e de arabinose. O conteúdo total de pentosanas nos grãos de trigo é de cerca de 7%, dos quais apenas 1-3% se encontram no endosperma.

As pentosanas são geralmente divididas em pentosanas hidrossolúveis e pentosanas não hidrossolúveis, de acordo com a sua solubilidade na água. No endosperma, as pentosanas hidrossolúveis constituem apenas cerca de 1-1.5% do teor de pentosanas. As pentosanas não hidrossolúveis diferem das pentosanas hidrossolúveis por possuírem um maior grau de ramificação e maior massa molecular. As pentosanas hidrossolúveis possuem um grau de polimerização de 160-190 enquanto que as não hidrossolúveis apresentam um grau de polimerização superior a 900. As pentosanas não hidrossolúveis são usualmente extraídas com soluções alcalinas.

A estrutura e a composição das pentosanas hidrossolúveis têm sido extensivamente estudadas por outros autores (Perlin, 1951a,b; Ewald e Perlin, 1959; Fincher e Stone, 1974; Patil *et al.*, 1975; Hosney e Faubion, 1981; Delcour *et al.*, 1989; Hoffman *et al.*, 1992; Izydorczik *et al.*, 1991; Izydorczik e Biliaderis, 1992). As arabinoxilanas são compostas por uma cadeia principal de resíduos de D-xilopiranosilo ligados entre si por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. À cadeia principal encontram-se ligados resíduos de L-arabinofuranosilo na posição C2 ou C3 (substituição simples) ou nas posições C2 e C3 (substituição dupla) (Figura 1.10). As cadeias laterais são constituídas apenas por um resíduo de açúcar. Os resíduos de arabinose podem ocorrer em resíduos de xilose isolados da cadeia xilana, em dois, menos frequentemente em três, mas não em quatro ou mais resíduos consecutivos (Ewald e Perlin, 1959).

Para além de xilose e de arabinose, as pentosanas hidrossolúveis possuem também galactose, glucose, ácido ferúlico e proteína ligada covalentemente. Nas pentosanas, a

galactose encontra-se geralmente sob a forma de arabinogalactanas, um biopolímero constituído por uma cadeia principal de unidades de galactose à qual se encontram ligados resíduos de arabinose. As arabinogalactanas e as arabinoxilanas representam os dois principais polímeros constituintes das pentosanas (Biliaderis *et al.*, 1992; Martinant *et al.*, 1999).

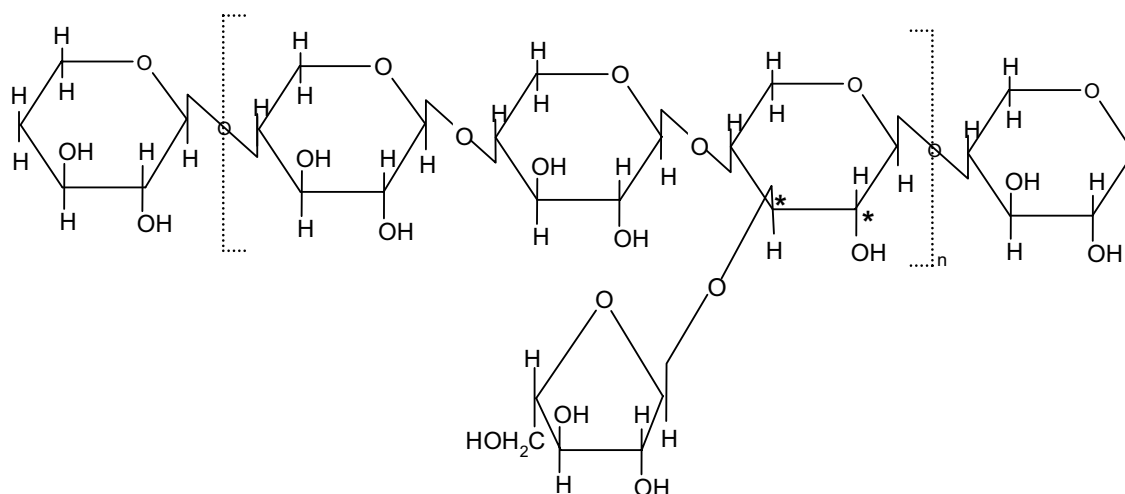


Figura 1.10 - Estrutura básica das arabinoxilanas hidrossolúveis; n, número determinado de unidades de polímero; *, posições em que se localizam as ramificações

I. 1.3.3.1.2. Propriedades

As pentosanas hidrossolúveis apresentam são capazes de imobilizarem a água, formando soluções bastante viscosas ou géis através de ligações covalentes (Baker *et al.*, 1943; Geissman e Neukom, 1973; Izydirczyk *et al.*, 1990; Vinkx *et al.*, 1991; Figueroa – Espinoza *et al.*, 1999), exibindo um comportamento reofluidificante.

Diferenças estruturais em termos da razão dos monossacarídeos constituintes, teor de ácido ferúlico e massa molecular têm sido encontradas em arabinoxilanas de diferentes variedades de trigo (D'Appolonia e MacArthur, 1975; Ciacco e D'Appolonia, 1982; Izydorczyk *et al.*, 1991). Estas diferenças levam a que PHS provenientes de diferentes variedades exibam capacidades de gelificação diferentes (Ciacco e D'Appolonia, 1982).

As propriedades físicas das arabinoxilanas são influenciadas pelo grau de substituição. A razão arabinose/xilose é uma medida directa do grau de substituição constituindo uma característica estrutural e funcional importante (Courtin e Delcour, 1998). Se por hidrólise alguns resíduos de arabinose forem retirados à cadeia central, a estrutura da cadeia xilana torna-se mais flexível. A remoção parcial dos resíduos de arabinose diminui a solubilidade das PHS uma vez que as secções de xilana sem resíduos podem formar ligações de hidrogénio entre polímeros de xilanas, dando origem a agregados insolúveis (Andrewartha *et al.*, 1979). Cadeias com um elevado grau de substituição apresentam uma conformação tipo bastão, o que em parte é responsável pela elevada viscosidade das soluções de arabinoxilanas (Dea *et al.*, 1973; Andrewartha *et al.*, 1979).

As PHS possuem também a capacidade gelificarem sob a acção de agentes oxidantes. Por exemplo, quando a uma solução de PHS é adicionado peróxido de hidrogénio, as PHS formam um gel, mais ou menos forte dependendo da concentração do polímero e do oxidante. Esta capacidade exibida pelas PHS tem sido atribuída à presença do ácido ferúlico, o qual forma pontes diferúlico entre polímeros adjacentes (Neukom *et al.*, 1967; Marwalker e Neukom, 1976). Este facto pode ser visível num espectro de absorvância das PHS. Kundig *et al.* (1961) mostraram que o pico a 320 nm atribuído ao ácido ferúlico desaparece após a adição de agentes oxidantes. O papel activo do ácido ferúlico no estabelecimento de pontes diferúlico foi também referido por Hosney e Faubion (1981). Estes autores mostraram que, em condições de gelificação oxidativa, a adição de ácido ferúlico e de resíduos de cisteína travou o aumento da viscosidade induzido pelo agente oxidante.

I. 1.3.3.1.3. Importância das pentosanas na panificação

Apesar de contabilizarem apenas com uma pequena percentagem na composição das farinhas de trigo, as pentosanas apresentam um papel bastante importante na panificação.

Tem sido reportado que as PHS e as PNHS possuem diferentes efeitos no processamento do pão. Embora alguns resultados sejam contraditórios, as PHS são geralmente consideradas por influenciarem positivamente o comportamento da massa bem como a textura e o volume do pão (Jelaca e Hlynka, 1972; Patil *et al.*, 1976; Hosney, 1984; Vanhamel *et al.*, 1993; Michniewicz *et al.*, 1991; Izydorczik e Biliaderis, 1995; Courtin e

Delcour, 1998), enquanto que para as PNHS um efeito contrário tem sido observado (Hoseney, 1984; Roels *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2002). É geralmente aceite que o impacto das PHS no processo de panificação está relacionado com a sua elevada afinidade para a água (Jelaka e Hlynka, 1971, 1972; Michniewicz *et al.*, 1991 Rouau e Moreau, 1993). Esta característica exibida pelas pentosanas exerce um efeito positivo na absorção de água pela farinha e na distribuição da água entre os vários componentes.

A capacidade de gelificação das PHS contribui para o comportamento viscoelástico e desenvolvimento das massas de pão, resultando na produção de pães com maior volume, mais elásticos e com uma textura mais uniforme (Hoseney *et al.*, 1969; Patil *et al.*, 1975; Meuser e Suckow, 1986). A redução do conteúdo de pentosanas conduz à formação de massas mais fracas e pouco consistentes, produzindo pães com menor volume e textura não uniforme (Hoseney *et al.*, 1969; McCleary, 1986). O aumento de viscosidade diminui a difusão do CO₂ libertado durante a fermentação (Hoseney, 1984; Meuser e Suckow, 1988) promovendo assim um maior crescimento da massa. Neste aspecto as pentosanas desempenham uma função semelhante ao glúten.

A maior afinidade pela água exibida pelas pentosanas retarda o processo de envelhecimento do pão, por reduzir a disponibilidade de cadeias de amido disponíveis para a cristalização (Kim e D'Appolonia, 1977; Longton e Legrys, 1981; Gudmundsson *et al.*, 1991; Eliasson and Larsson, 1993). As pentosanas não coagulam com o aumento de calor, tal como acontece com as proteínas, nem sofrem retrogradação durante o arrefecimento, tal como acontece com o amido, pelo que as pentosanas têm um efeito positivo na manutenção da frescura e aumento do tempo de prateleira do pão (Meuser e Suckow, 1988; Eliasson e Larsson, 1993; D'Appolonia and Rayas-Duarte, 1994; Evers *et al.*, 1999).

I. 1.3.3.2. Lípidos

Nas farinhas de trigo os lípidos constituem cerca de 2.5% do seu peso seco e estão agrupados em lípidos polares e lípidos não polares. A distribuição das várias classes de lípidos varia entre as partes anatómicas dos grãos de trigo o que confere aos lípidos funções de estrutura ou de reserva consoante o tipo de tecido em que se encontram.

Os lípidos não polares (70% do teor total de lípidos) são maioritariamente constituídos por triglicerídeos e encontram-se, principalmente, no gérmen e na camada aleuronal. Os triglicerídeos ocorrem como reserva de alimento, na fase líquida à temperatura ambiente, sob a forma de uma emulsão de esferossomas. Os lípidos polares fazem parte da composição e estrutura das paredes e membranas celulares sendo essencialmente constituídos por fosfolípidos (20% do teor total de lípidos) e glicolípidos (10% do teor total de lípidos). Durante a moagem, alguns lípidos são transferidos do gérmen e da aleurona para o endosperma, sendo portanto introduzidos na composição da farinha (Hoseney, 1998; Morrison, 1994; Eliasson e Larsson, 1993).

Todos os lípidos são solúveis em solventes orgânicos. Quando uma farinha de trigo é extraída com um solvente não polar (ex. clorofórmio ou éter de petróleo), apenas uma parte dos lípidos é removida. Os outros lípidos estão geralmente ligados ao amido, às proteínas ou a outros componentes, sendo por isso necessário usar solventes mais polares de modo a quebrar estas ligações. Nesta perspectiva, é comum separar os lípidos da farinha de trigo em dois grupos: os lípidos ligados ao amido (LA) e os lípidos não ligados ao amido (LNA). Os LNA sendo lípidos livres são facilmente removidos com solventes não polares. O conceito de lípidos livres é muitas vezes arbitrário uma vez que a quantidade e a composição dos lípidos livres (ou LNA) extraídos depende do grau de polaridade do solvente, da humidade e tamanho de partículas da farinha (Morrison, 1994). Alguns lípidos livres tornam-se ligados ao glúten quando a farinha é hidratada. Neste ponto existe quantidade de água suficiente para permitir a formação de uma estrutura coesa de glúten e a mistura da massa promove uma maior ligação dos lípidos à proteína. Os LNA englobam várias classes de lípidos, sendo cerca de 60% lípidos não polares (triglicerídeos), 25% glicolípidos e 15% fosfolípidos. Os LNA diferem entre si na sua habilidade para formarem estruturas organizadas na presença de água (lipossomas, vesículas, camadas duplas). Os triglicerídeos são incapazes de formarem este tipo de estruturas. Os lípidos polares são lípidos de membranas e formam fases cristal-líquido em forma de lamelas na presença de água (Larsson, 1988; Le Meste e Davidou, 1995). Os LA, uma vez fortemente ligados ao amido, são na sua maior parte extraídos com isopropanol, butanol:água saturada, ou metanol. São constituídos por lípidos não polares (9%), glicolípidos (5%) e fosfolípidos (86%) dos quais 85% são lisofosfatidilcolina.

I. 1.3.3.2.1. Importância dos lípidos na panificação

Os lípidos influenciam a qualidade de uma farinha para a panificação. São relativamente estáveis quando presentes no grão, podendo acontecer a deterioração da qualidade para a panificação após muitos anos. As principais alterações de lípidos ocorrem após a moagem dos grãos, uma vez que os lípidos estão mais dispersos e mais disponíveis para a degradação enzimática. Durante um armazenamento longo e mal acondicionado, por acção das lipases, o conteúdo em ácidos gordos livres e lisofosfolípidos aumenta, e o produto resultante da oxidação enzimática dos mesmos tem um efeito bastante negativo nas propriedades organolépticas e funcionais de uma farinha.

A razão lípidos livres não polares / lípidos livres polares é um parâmetro bastante importante para a determinação da qualidade de panificação de uma farinha. Os lípidos polares, especialmente os glicolípidos, têm um efeito bastante positivo no aumento do volume do pão e na estrutura da crosta do pão, uma vez que actuam como estabilizantes da interface ar/água durante o crescimento da massa. A adição de lípidos não polares reflecte-se na diminuição do volume do pão uma vez que os ácidos gordos livres insaturados enfraquecem a rede de glúten diminuindo a sua capacidade de expansão e retenção do CO₂ libertado durante a fermentação (Morrison, 1994; Eliasson e Larsson, 1993).

I. 1.4. Interacções entre os componentes e sua importância na panificação

Do ponto de vista biológico, a farinha de trigo apresenta-se como um sistema naturalmente complexo e interactivo. As suas propriedades funcionais são ditadas pelas interacções físicas e químicas que ocorrem entre os seus componentes, quer durante o crescimento e maturação do grão, quer durante a formação, desenvolvimento e cozimento da massa de pão.

I. 1.4.1. Interacções com a água

Para que as alterações características, e portanto as interacções entre os componentes, possam ocorrer numa massa de pão, é necessário, primeiramente, adicionar água à farinha. Devido ao seu carácter dipolar, a água representa um papel bastante importante nas interacções entre os vários ingredientes da farinha. A extensão destas interacções depende

do tipo de componente em causa, uma vez que ligações como as pontes de hidrogénio, e os efeitos hidrofílicos e hidrofóbicos são particularmente relevantes nas interacções com a água. Para além da simples adição da água, as interacções são ainda mais potenciadas pela mistura e amassamento da massa, o que transformará a mistura farinha/água numa massa com determinadas propriedades viscoelásticas.

A massa de farinha pode ser considerada como um sistema fluido viscoelástico no qual estão dispersos vários componentes, uns solúveis, outros não. A absorção de água pela farinha não é igual entre os vários componentes, pelo que a distribuição da água entre as partículas de farinha não acontece de modo uniforme (Bushuk, 1966). A competição pela água resulta da tendência da água de estar envolvida em ligações de hidrogénio, quer com outras moléculas de água, quer com os átomos electronegativos de outros solutos. Solutos (ou grupos numa molécula) hidrofílicos mostram uma tendência para serem hidrossolúveis. Moléculas polares ou não-polares são hidrofílicas se tiverem átomos electronegativos capazes de se associarem com a rede de ligações de hidrogénio e também se tiverem a geometria mais adequada relativamente à rede formada pela água (Le Meste *et al.*, 1995).

Nos alimentos, grande parte das interacções entre grupos ou moléculas são mediadas pela água. Por exemplo, a ligação de lípidos polares às gluteninas acontece pela adição da água (Olcott e Mecham, 1947). Esta associação específica dos lípidos às gluteninas é bastante importante para o desenvolvimento de uma massa com a viscoelasticidade adequada para o fabrico de pão. A gelatinização do amido ocorre somente quando os grânulos de amido estão hidratados. Bernardin e Kasarda (1973) e Amend e Belitz (1989) reportaram que, quando em contacto com a água, as proteínas do glúten ficam hidratadas exibindo fibrilas que interactuam entre si, formando ligações cruzadas entre as partículas da farinha, constituindo assim uma rede de ligações.

A solubilização de proteínas solúveis, sobretudo enzimas, permite uma melhor distribuição e melhor contacto com o substrato (proteínas, lípidos, hidratos de carbono) o que, para o caso da fermentação da massa de pão, se torna uma condição fundamental para a sua ocorrência.

A água pode afectar a estrutura de componentes da farinha através do seu efeito plasticizante (Cocero e Kokini, 1990; Le Meste *et al.*, 1995; Gontard e Ring, 1996). O termo plasticização significa um aumento geral da mobilidade molecular. Ou seja, os componentes que no seu estado natural são amorfos (portanto, relativamente instáveis),

como é o caso do amido, quando hidratados e/ou através do aumento da temperatura podem desenvolver uma mobilidade ditada por uma maior liberdade de movimentos ao nível molecular. Com o tempo e por desidratação, poderão observar-se reorganizações estruturais (modificações de conformação molecular) que, sendo irreversíveis, poderão ter consequências prejudiciais na textura do produto final, tal como acontece durante o processo de envelhecimento do pão (Le Meste *et al.*, 1995; Slade e Levine, 1994; Hosene *et al.*, 1986; Cocero e Kokini, 1991). Para um dado nível de hidratação, a plasticização pela água pode diferir bastante de uma região para a outra do sistema. Em condições de hidratação limitada, algumas regiões estão facilmente acessíveis à água (resíduos polares de superfície), enquanto que outros não estão acessíveis (resíduos apolares escondidos). Quando se consideram proteínas, por exemplo, um comportamento complicado pode ser esperado como resultado da sua estrutura heterogénea (Le Meste *et al.*, 1995). As zonas mais expostas poderão ser mais facilmente hidratadas do que as zonas mais internas.

I. 1.4.2. Interacções amido-proteínas

Representando o principal componente das farinhas de trigo, o amido apresenta-se como um elemento-chave nas interacções entre os demais componentes da farinha. As interacções amido-proteína ocorrem em todos os estágios do processamento do trigo e são relevantes não só para a funcionalidade da farinha como também para a qualidade do produto final.

O grau de interacções entre os grânulos de amido e os outros constituintes das farinhas está associado com a composição da superfície dos mesmos, sendo esta constituída essencialmente por cadeias de amido, proteínas de superfície e fosfolípidos (Kulp e Lorenz, 1981; Russell, 1983). As proteínas são moléculas anfifílicas o que lhes confere a capacidade de se adsorverem às superfícies. No grão de trigo, as interacções proteína-amido estão associadas à dureza do endosperma do grão o que irá influenciar as características de moagem (Sandstedt e Schroeder, 1969; Barlow *et al.*, 1973; Schofield e Greenwell, 1987; Eliasson e Larsson, 1993; Schofield, 1994; Preston, 1998; Bloch *et al.*, 2001). A dureza do endosperma é um importante critério na determinação da qualidade e funcionalidade do trigo. Farinhas obtidas a partir do trigo mole são usadas para a produção de biscoitos e bolos, enquanto que a produção de pão geralmente requer farinhas obtidas a

partir de trigo duro. O trigo de maior grau de dureza é utilizado para a produção de massas alimentícias. O grau de dureza influencia todo o processo de moagem, tal como a quantidade de energia utilizada, o grau de separação do farelo do endosperma, a forma e o tamanho das partículas de farinha e a quantidade de amido danificado, o qual irá condicionar a capacidade de absorção de água das farinhas (farinhas moles apresentam maior absorção do que farinha duras). A dureza do endosperma parece estar ligada com o grau de adesão entre a proteína e os grânulos de amido, o que estará relacionado com a presença ou não, de uma determinada proteína na superfície dos mesmos. Esta proteína encontra-se em níveis muito baixos nos grânulos de amido de trigo duro e em níveis elevados nos grânulos de amido de trigo mole. Pensa-se que esta proteína funciona como um agente anti-adesivo prevenindo a forte adesão entre o amido e a matriz proteica, característica típica dos trigos duros (Greenwell e Schofield, 1986; Glenn e Saunders, 1990; Glenn e Johnston, 1992; Malouf *et al.*, 1992; Giroux e Morris, 1998). Esta proteína foi identificada por Greenwell and Schofield (1986) por SDS-PAGE de alta resolução, sendo uma proteína com uma massa molecular de 15 kDa, denominada friabilina. Esta proteína foi também encontrada noutras espécies *Triticea*, tal como no centeio, cereal caracterizado por um endosperma com uma textura mole (Morrison *et al.*, 1992). Estando directamente relacionada com o parâmetro “dureza”, a friabilina pode funcionar como um marcador molecular do grau de dureza dos grãos de trigo, característica tecnológica que poderá ser controlada e identificada mais rapidamente através da realização de ensaios imunológicos.

Dada a diferente polaridade existente entre as moléculas de proteína, as proteínas de superfície condicionam ainda o carácter hidrofóbico e hidrofílico dos grânulos de amido e, portanto, uma maior ou menor interacção com a água. Para além destas proteínas, outras proteínas como enzimas desempenham uma acção bastante importante sobre o amido. A amilases quebram a estrutura da amilose e da amilopectina libertando monómeros de glucose que irão entrar na fermentação da massa pelas leveduras. Uma maior quantidade de amido danificado representa uma maior disponibilidade de amido para a hidrólise pelas amilases.

Durante a mistura e amassamento da massa, os grânulos de amido estão dispersos, preenchendo os espaços entre a rede de glúten e alinhando-se na direcção da tensão da matriz proteica (Eliasson e Larsson, 1993). A distribuição bimodal dos grânulos de amido

torna-se importante nesta fase, contribuindo para um melhor empacotamento da rede proteica. Os grânulos mais pequenos encaixam-se melhor nos espaços mais pequenos da rede de glúten e entre os grânulos de maior tamanho. Experiências realizadas com esferas de vidro demonstraram que os grânulos de amido não funcionam apenas como preenchimento da matriz proteica, desempenhando um efeito bastante importante (Sandstedt, 1961). Os grãos de trigo providenciam uma boa superfície de contacto através da qual as proteínas do glúten absorvem a água. Estas interações diferem entre os vários tipos de amido e entre as diferentes fracções proteicas. Estudos sobre o efeito do amido em farinhas reconstituídas com amidos de diferentes origens botânicas, demonstraram que apenas o amido proveniente do trigo produz um pão com características aceitáveis (Harris, 1942; Sandstedt, 1961; Hosney *et al.*, 1971; Kulp *et al.*, 1991). Quando em contacto com a água, o amido entra em competição com o glúten pela água estabelecendo com esta ligações de hidrogénio, não se solubilizando. A adesão entre o amido e a proteína depende da concentração de água. A baixos teores de água, a interacção entre amido e proteína é mais forte, enquanto que para valores mais elevados de conteúdo de água, as ligações entre amido e proteína são mais fracas, podendo o amido ser facilmente separado por lavagem (Sandstedt *et al.*, 1954; Huang e Moss, 1991; Amend e Belitz, 1991). Estudos microscópicos indicam ainda que as interações entre amido e proteína aumentam durante o amassamento e diminuem após o ponto de amassamento excessivo (Evans *et al.*, 1981). No nível óptimo de desenvolvimento da massa, os grânulos de amido actuam como pontos de fixação facilitando a formação de fibrilhas de gluten durante o estiramento da massa (Cumming e Tung, 1977).

Quando a massa é transformada em pão, durante a cozedura, o amido gelatiniza, transformando-se completamente. A presença do glúten aumenta a temperatura de gelatinização do amido (Eliasson e Larsson, 1993). É o efeito conjunto do aumento de viscosidade do amido e da retirada de água do glúten que define a forma e a estrutura do pão que passa de um sistema espumoso (massa) para um sistema esponjoso (pão). A estrutura do pão envolve a interacção entre o gluten hidratado, os grânulos de amido intumescidos (sobretudo os grânulos maiores) e as moléculas de amilose e amilopectina de amido (Pomeranz *et al.*, 1984; Bechtel, 1985). Com o arrefecimento, o amido recristaliza-se e o miolo do pão aumenta de firmeza. A presença de proteína afecta a taxa de retrogradação ou de envelhecimento do pão, sendo esta menor quando a concentração de

proteína é maior. Um pão sem glúten envelhece muito mais rapidamente do que um pão com glúten (Eliasson e Larsson, 1993). A presença de proteína afecta quer a distribuição da água, quer as propriedades reológicas da fase contínua, o que, consequentemente, irá afectar o processo de recristalização do amido. Apesar de a retrogradação do amido e o aumento de firmeza ocorrerem simultaneamente, os dois processos não são necessariamente causa-efeito. O aumento de firmeza parece estar relacionado com a formação de uma rede de ligações de hidrogénio entre o amido e o glúten (Dragtsdorf e Varriano-Marston 1980; Morris *et al.*, 1980; Martin e Hoseney, 1991).

Na massa de pão, as interacções entre amido e proteína são muito sensíveis e são afectadas pela presença de outros ingredientes tais como sais, cisteína, açúcares e emulsionantes.

I. 1.4.3. Interacções Amido-Lípidos

Os lípidos presentes na massa farinha são provenientes quer da própria constituição dos grãos de trigo, quer da adição de outros ingredientes durante a formulação do pão. Qualquer que seja a sua origem, os lípidos são bastante importantes para a determinação das propriedades organolépticas do pão e a sua funcionalidade é manifestada pela sua interacção com os outros componentes da farinha. Apesar de os lípidos constituírem apenas uma pequena fracção da farinha, o efeito da sua presença nas propriedades do amido é bastante relevante.

No grão de trigo, devido à compartimentalização inerente, os lípidos e o amido não estão em contacto directo, com a excepção do complexo amilose-lípidos. As interacções entre lípidos e amido apenas se começam a manifestar após a adição de água à farinha de trigo e após o aumento da temperatura do sistema (Eliasson, 1998). Para estes dois componentes é possível distinguir dois tipos de interacções: a ligação molecular entre lípidos e amido, tal como é o caso do complexo formado entre a amilose e os lípidos, e a interacção entre a fase lipídica (micelas) da massa de farinha e o amido.

A fase lipídica da massa de farinha é constituída essencialmente por triglicerídeos provenientes dos lípidos constituintes das paredes celulares do grão de trigo, ou daqueles adicionados sob a forma de gorduras ou emulsionantes. Estes lípidos actuam sobretudo sobre as propriedades de retrogradação do amido. A sua presença reduz a formação de cristais grandes durante a retrogradação, impedindo a formação de uma rede de ligações

entre as moléculas de amilose. A ligação de triglicerídeos à superfície dos grânulos afecta a interacção destes com a fase contínua envolvente. A formação de uma camada lipídica na superfície dos grânulos afecta a distribuição de água nos mesmos, o que se reflecte não só na alteração das propriedades reológicas do amido como também nos mecanismos de gelatinização e retrogradação do amido (Eliasson, 1998).

No caso do complexo amilose-lípidos, a interacção entre moléculas individuais de lípidos essencialmente polares e a molécula de amilose é movida pelo efeito hidrofóbico, isto é, a estrutura helicoidal da molécula de amilose oferece um ambiente mais favorável para a cadeia do hidrocarboneto do que a água envolvente (Kowblansky, 1985). A estrutura do complexo amilose-lípidos é semelhante à do complexo amilose-iodo. À temperatura ambiente, a formação de mais complexos amilose-lípidos na massa de farinha só acontece com a libertação de mais moléculas de amilose por danificação do amido e sua complexação com os lípidos constituintes da farinha ou adicionados na formulação do pão. Durante o aquecimento e cozedura da massa de farinha, as moléculas de lípidos e amilose encontram-se disponíveis em maior extensão, pelo que a formação de novos complexos amilose-lípidos é também observada (Eliasson, 1998).

Os lípidos polares ligados ao amido afectam as propriedades de gelatinização e de retrogradação do amido (Eliasson *et al.*, 1981; Tester e Morrison, 1990; Biliaderis e Tonogai, 1991; Eliasson e Larsson, 1993). Devido ao efeito hidrofóbico dos lípidos, a interacção amido-água é afectada, o processo de absorção e aumento de volume dos grânulos é mais lento, e o tamanho e a forma dos grânulos de amido são alterados. Com a adição de lípidos, a temperatura de gelatinização do amido é maior e a quantidade de amilose lixiviada para o exterior é menor, pelo que o gel formado após a gelatinização é mais fraco e o produto final mais frágil. A força do gel formado e a variação na temperatura de gelatinização do complexo dependem não só da concentração do ligando como também do tipo de lípido que constitui o mesmo. A temperatura de gelatinização aumenta com o aumento do tamanho da cadeia e diminui com o aumento do grau de insaturação do ligando (Eliasson e Krog, 1985; Mestres *et al.*, 1988). A temperatura de gelatinização do complexo amilose lípidos é também sensível ao conteúdo de água. Uma diminuição do teor de água implica que sejam necessárias temperaturas mais elevadas para que se inicie o fenómeno de gelatinização (Biliaderis *et al.*, 1986; Jovanovich *et al.*, 1992). Na presença de lípidos, a taxa de retrogradação do amido é menor. Apesar deste efeito ser

referido como sendo devido ao complexo amilose-lípidos, estudos de tensão superficial indicam a existência de lípidos ligados a moléculas de amilopectina (Hahn e Hood, 1987) o que evidencia a ideia de que a formação de complexos com lípidos não é uma característica exclusiva da amilose. Estudos sobre amidos “waxy” (essencialmente constituídos por amilopectina) demonstram que as propriedades térmicas e reológicas destes amidos são também alteradas na presença de lípidos (Evans, 1986; Eliasson *et al.*, 1988). Os lípidos poderão associar-se com a amilopectina através das cadeias ramificadas da molécula (Hizukuri, 1985). Na sua forma complexada, a amilose apresenta maior resistência à degradação enzimática, estando esta resistência também relacionada com o tipo de lípidos presente no complexo.

A formação do complexo amilose-lípidos afecta não só as propriedades do amido como também a composição e propriedades dos lípidos. A presença de amilose origina uma diminuição da composição dos lípidos devido à formação do complexo. Os lípidos presentes são assim deslocados da fase lipídica para as moléculas de amilose, diminuindo a quantidade de lípidos disponíveis para a interacção com outros componentes. Ao estarem associados com as moléculas de amilose, os lípidos tornam-se também menos susceptíveis à degradação enzimática, o que constitui um mecanismo importante no controlo da oxidação lipídica (Eliasson, 1998).

I. 1.4.4. Interacções Proteína-lípidos

A interacção entre lípidos e proteínas representa um papel fundamental na formação e nas propriedades da massa de farinha. Os lípidos participam na formação da rede de glúten necessária para a formação de uma espuma sólida durante a cozedura do pão e melhoram a elasticidade e a extensibilidade da massa através da formação de pontes de ligação entre as gluteninas e as gliadinas (Le Meste e Davidou, 1995).

No grão de trigo, os lípidos e proteínas interactuam essencialmente nas membranas celulares. Após a moagem, as membranas são quebradas e grande parte dos lípidos fica dispersa na farinha. Os lípidos livres da farinha interactuam com o glúten sobretudo durante a hidratação e amassamento da massa. Depois do contacto com a água, a extracção de grande parte dos lípidos associados ao glúten torna-se mais difícil, o que reforça a ideia de que as interacções entre lípidos e glúten são reforçadas pela presença de água (Olcott e

Mecham, 1947; Chung e Pomeranz, 1981; Ross e MacRitchie, 1995). Os lípidos que interactivam com o glúten são essencialmente lípidos polares (galactolípidos e fosfolípidos). Quando em contacto com a água, os grupos polares destes lípidos ficam voltados para a água formando estruturas organizadas (micelas, camadas duplas) que ficam presas na rede de glúten. O glúten transforma-se então num sistema multifásico onde a microemulsão óleo/água é estabilizada pelas proteínas (Nishiyama *et al.*, 1981; Hargreaves *et al.*, 1994). As micelas e vesículas lipídicas podem formar fases líquido-cristalinas laminares que são dispersas espontaneamente sob a forma de agregados de dupla camada (lipossomas), durante a mistura. Estes agregados conduzem à formação de monocamadas ou filmes estabilizam a interface ar/água, reforçando o sistema espumoso formado durante a fermentação e durante a incorporação de ar na massa. As proteínas solúveis da farinha possuem também actividade de superfície (propriedades interfaciais) e capacidade de formarem filmes, propriedades estas que vão contribuir para um aumento de resistência da massa, para uma melhor capacidade de retenção de gás da massa e para o aumento de volume do pão (Larsson, 1988; Bushuk, 1988; Eliasson e Larsson, 1993). A estrutura e a estabilidade das células de gás são afectadas por alteração do conteúdo e composição de lípidos. Lípidos não polares têm um efeito negativo sobre as propriedades de retenção de gás. A viscoelasticidade da massa influencia a dinâmica das estruturas lipídicas dispersas na massa de farinha e controla a expansão das bolhas de ar estabilizadas pelos filmes lipoproteicos (Marion *et al.*, 1998).

Na presença de lípidos, as moléculas de gliadina formam agregados de elevada massa molecular. A formação destes agregados é reversível e parece ser mediada pela presença de galactolípidos (Lásztity, 1996). A maior afinidade demonstrada pelas gliadinas relativamente à sua ligação com os lípidos parece estar relacionada com a existência de uma proteína que serve de ligação entre as moléculas de gliadina e os lípidos. Esta proteína foi isolada por Frazier *et al.* (1985) e foi denominada por ligolina. Uma outra proteína de ligação (proteína-S) foi isolada por Zawistowska *et al.* (1985) e parece também participar na formação dos agregados de gliadinas. A associação de lípidos às gluteninas ocorre durante a mistura da massa, pelo que a extensão destas interacções está dependente da intensidade da acção mecânica exercida sobre a massa. Através da interacção com os lípidos, as moléculas de gliadina e glutenina podem estabelecer ligações entre si,

melhorando as propriedades elásticas da rede de glúten (Zawistowska *et al.*, 1985; Ross e MacRitchie, 1995; Lásztity, 1996)

I. 1.4.5. Interações Proteína-proteína

A formação de uma rede viscoelástica capaz de reter o gás formado durante a fermentação faz do trigo o cereal eleito na panificação e é a expressão de um conjunto de interações entre os componentes proteicos que constituem o glúten. Do ponto de vista funcional, o glúten pode ser considerado como uma macromolécula onde todos os seus componentes interactivam de um modo covalente ou não-covalente. Na massa de farinha e água, as principais interações ocorrem entre as gliadinas e as gluteninas. As proteínas citoplasmáticas ou hidrossolúveis (albuminas e globulinas) embora também se encontrem envolvidas em algumas interações com o gluten, o seu papel não é tão significativo como os das proteínas de reserva (Wrigley *et al.*, 1998).

O grau de interação entre as proteínas do glúten depende de vários factores como a distribuição molecular, o tipo de estrutura, e a densidade das ligações dissulfeto e ligações não-covalentes. A densidade das ligações dissulfeto depende do teor em aminoácidos (cisteína) contendo átomos de enxofre (ou grupos sulfidril/tiol) disponíveis para a formação das ligações S-S. A distribuição dos grupos -SH e, consequentemente, a tendência para a formação de ligações S-S, varia entre as diferentes moléculas que constituem o glúten. As gliadinas- ω , por apresentarem um teor praticamente nulo em átomos de enxofre não são susceptíveis à formação de ligações S-S com outras moléculas de proteínas, ficando limitadas apenas à formação de ligações não-covalentes. As gliadinas- α , - β e - γ apresentam ligações S-S intramoleculares essenciais para a estabilização da sua estrutura dobrada, restringindo assim o número de átomos S envolvidos em ligações S-S intermoleculares. As gluteninas possuem grupos sulfidril/tiol que estabelecem ligações intra- e intermoleculares com outras moléculas de gluteninas. As gluteninas de elevada massa molecular são as que mais contribuem para o fortalecimento da massa de farinha por possuírem grupos de cisteína disponíveis para a formação de ligações S-S em ambas as extremidades da molécula, enquanto que as moléculas de gluteninas de baixo peso molecular apenas exibem esta capacidade numa das extremidades (terminal-C).

A importância do papel das ligações S-S na manutenção das propriedades funcionais e estruturais do glúten tem sido demonstrada pela adição de agentes redutores a amostras de glúten e de massas de farinha. Agentes redutores como o ditionitrito e o SDS, quebram as ligações S-S das moléculas de glutenina levando à desintegração do glúten, efeito este que é geralmente acompanhado por uma diminuição da distribuição de massas moleculares e enfraquecimento da matriz proteica. A redução (quebra) das ligações S-S das moléculas de gliadina não envolve alterações significativas na massa molecular (Beckwith e Wall, 1965, 1966). A restauração das propriedades reológicas originais é praticamente reversível após reoxidação (com a adição de bromato, por exemplo) (Jones *et al.*, 1971; Bekes *et al.*, 1994; Lásztity, 1996; Wrigley *et al.*, 1998).

Durante a mistura e amassamento de uma massa de pão, a solubilidade das proteínas do glúten aumenta devido à desintegração da estrutura macromolecular. Durante o repouso da massa, algumas das ligações S-S anteriormente perdidas são recuperadas (Donzek e Bushuk, 1968; Lásztity, 1996). Quando a massa é aquecida, o aumento de temperatura induz a formação de novas pontes S-S, o que ajuda a massa a adquirir a sua estrutura firme.

Para além do papel importante das ligações S-S na determinação das propriedades reológicas do glúten, também as ligações de hidrogénio e as ligações hidrofóbicas contribuem para as interacções entre as moléculas do glúten. As proteínas do glúten contêm um grande número de cadeias laterais que podem formar pontes de hidrogénio. Estudos realizados com D₂O mostraram que o glúten hidratado com D₂O fica mais forte e mais elástico, possivelmente devido a um aumento do número de ligações de hidrogénio formadas (Vakar *et al.*, 1965; Hosney, 1998). Os resíduos de glutamina têm sido apontados como sendo bastante importantes na determinação do carácter dinâmico e elástico do glúten, pelo estabelecimento de ligações de hidrogénio intra- e intermoleculares quer entre resíduos de glutamina, quer entre estes e a água (Belton *et al.*, 1994, 1998; Gil *et al.*, 1997a, 1997b). As cadeias laterais de glutamina funcionam simultaneamente como dadores e como receptores. Quando o glúten é hidratado, as pontes de hidrogénio formadas entre resíduos de glutamina no glúten seco são destruídas e novas ligações de hidrogénio são estabelecidas com a água, conferindo uma certa mobilidade ao sistema. Alguns aminoácidos constituintes das proteínas do glúten (alanina, leucina, fenilalanina, isoleucina, valina e prolina) contêm cadeias laterais hidrófobas que podem interagir entre

si estabelecendo ligações hidrofóbicas. A solubilidade das gliadinas em solventes não polares parece ser uma indicação da existência deste tipo de ligações no estabelecimento da estrutura do glúten (Lásztity, 1996).

I. 1.4.6. Interações que envolvem as pentosanas hidrossolúveis

As pentosanas hidrossolúveis (PHS) contribuem para as propriedades funcionais de uma massa essencialmente através de interações não específicas com o amido e com o glúten. A acção das pentosanas sobre as propriedades viscoelásticas de uma massa deve-se essencialmente à sua capacidade de gelificação e ao seu tamanho molecular. A sua elevada capacidade de absorção de água afecta as propriedades de gelificação do amido, limitando a quantidade de água necessária para o intumescimento dos grânulos de amido. Uma característica distinta das pentosanas é a sua capacidade de gelificar quando sob a influência de certas substâncias oxidantes (ex. peróxido de hidrogénio). Esta característica é observável quer para soluções aquosas de pentosanas quer para suspensões de farinha. As PHS apresentam na sua constituição moléculas de ácido ferúlico que servem de unidades de ligação (ligações diferúlicas) durante a gelatinização oxidativa, transformando as PHS numa rede gelatinosa insolúvel (Gueissman e Neukom, 1973; Eliasson e Larsson, 1993; Izydorczyk *et al.*, 1990, 1991, 1995).

Quando em concentrações mais elevadas, as pentosanas hidrossolúveis podem interagir com as proteínas de modo a bloquearem a sua agregação numa rede viscoelástica. Por reacção com agentes oxidantes, as pentosanas podem ligar-se covalentemente com as proteínas do glúten através da reacção do ácido ferúlico com os grupos tiol da cisteína, reduzindo assim a disponibilidade de grupos -SH para a formação de ligações dissulfeto entre as moléculas de proteína do glúten

O tamanho molecular das pentosanas pode também influenciar as propriedades reológicas de uma massa de farinha. Tem sido observado que a massa molecular das pentosanas também varia entre diferentes variedades de trigo, pelo que o efeito das pentosanas pode variar entre farinhas de variedades diferentes. A massa molecular afecta o valor da viscosidade intrínseca e a força do gel formado. Quanto maior for o tamanho molecular, maior é a viscosidade intrínseca e maior é a força do gel (Eliasson e Larsson, 1993).

As pentosanas também possuem propriedades interfaciais pelo que têm uma acção positiva na estabilização do sistema espumoso do pão, após o aquecimento/cozimento (Izydorczyk *et al.*, 1991; Izydorczyk e Biliaderis, 1992; Eliasson e Larsson, 1993). Três componentes poderão competir pela interface ar/água: proteínas, lípidos e pentosanas. As proteínas apresentam uma acção mais importante na estabilização da interface ar/água durante a mistura e fermentação da massa, enquanto que os lípidos estabilizam a interface ar/água durante o crescimento da massa no forno. Deste modo, as pentosanas poderão complementar o efeito das proteínas e dos lípidos na estabilização da interface ar/água após a cozedura.

I. 2. Referência a alguns dos métodos de estudo das propriedades das farinhas de trigo e componentes

A reologia e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear foram as principais técnicas utilizadas ao longo do trabalho apresentado nesta tese. Os princípios e métodos destas técnicas são a seguir apresentados de uma forma muito resumida de modo a possibilitar a compreensão dos resultados apresentados.

I. 2.1. Reologia

A reologia pertence ao grande grupo das ciências físicas sendo definida como a ciência que estuda o escoamento da matéria e suas deformações (Worlow, 1980; Barnes *et al.*, 1989; Steffe, 1996). A palavra reologia foi primeiramente utilizada por Eugene C. Bingham (c. 1928). Numa definição mais objectiva, a reologia estuda a resposta de um material quando sobre ele é aplicada uma determinada força, sendo a resposta traduzida por uma determinada variável, como por exemplo, a elasticidade.

O conhecimento das propriedades reológicas de um material torna-se cada vez mais importante quer na indústria alimentar quer na indústria não alimentar. O conhecimento mais profundo da estrutura dos materiais permite a optimização do desenvolvimento de novos produtos, a melhoria do controlo de qualidade e o desenvolvimento de novos instrumentos para o seu manuseamento (Tung e Paulson, 1995; Steffe, 1996).

No caso de sistemas sólidos ou semi-sólidos, como são maioritariamente aqueles objecto do presente estudo, os parâmetros reológicos são geralmente representados por um módulo que traduz a tensão que é necessário aplicar para produzir uma determinada deformação. Este módulo é uma constante de proporcionalidade que relaciona a tensão e a deformação. Quando se aplica uma força (ou um conjunto de forças em equilíbrio) a um corpo em repouso, dois tipos de deformação podem acontecer: deformação linear ou uniaxial (Figura 1.11a) e deformação distorcional, tangencial ou de corte (Figura 1.11b). A deformação uniaxial pode ainda ser de tracção ou de compressão. A deformação de um material causada por uma força aplicada depende não da magnitude da força em si, mas da magnitude da força por unidade de área, ou seja, da tensão. Considerando os blocos representados na figura 1.11, a tensão (σ) exercida pode ser definida como:

$$\sigma = F / A \quad \text{eq. 1.1}$$

em que “F” designa a força aplicada e “A” a área sobre a qual a força F actua. σ é definido em N/m^2 ou Pa (pascal).

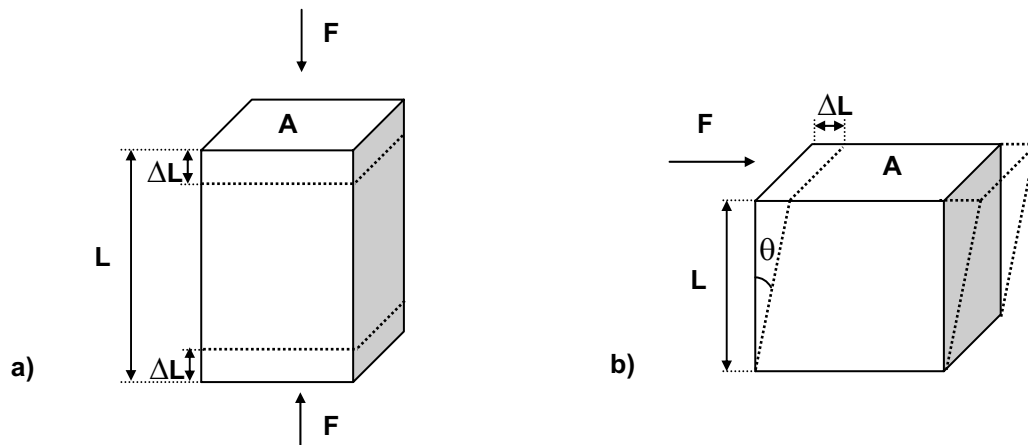


Figura 1.11 - (a) Compressão uniaxial (b) distorção, corte (“shear”)

A deformação linear ou uniaxial (ε) é definida como o deslocamento relativo de um ponto material na direcção em que ocorre essa deformação, ou seja:

$$\varepsilon = \Delta L / L \quad \text{eq. 1.2}$$

sendo L o comprimento inicial e ΔL o deslocamento sofrido.

A deformação distorcional ou de corte (γ) (Fig. 1.11 b), resultante de uma tensão tangencial, é definida pelo ângulo θ , o qual, para deslocamentos infinitesimais, é praticamente igual a $\Delta L/L$, ou seja:

$$\gamma = \Delta L / L \quad \text{eq. 1.3}$$

No estudo apresentado neste trabalho não foram realizados ensaios de tensão uniaxial, pelo que de seguida apenas se fará referência à deformação distorcional.

I. 2.1.1. Comportamentos Reológicos

Do ponto de vista reológico existem dois extremos de comportamento: o puramente elástico, característico de sólidos elásticos ideais (p.ex. mola elástica), e o puramente viscoso, característico de líquidos ideais (p.ex. água). No comportamento puramente elástico, quando uma força é aplicada a um material, este deforma-se instantânea e finitamente; quando a força é removida o material regressa instantaneamente à sua forma original. Materiais com este tipo de comportamento são designados por *sólidos de Hooke*. No comportamento puramente viscoso, quando uma força é aplicada a um material, neste caso um líquido, este deforma-se, ou flui, infinitamente, a uma taxa proporcional à magnitude da força aplicada; quando a força é removida, o líquido não tem a capacidade para retornar à sua forma inicial. Materiais com este tipo de comportamento são designados por *fluidos newtonianos*. Na realidade, nenhuns são os materiais que exibem o carácter idealmente elástico ou o carácter idealmente viscoso, ficando, a sua maioria, numa escala intermédia, sendo por isso denominados por materiais viscoelásticos. Os sistemas alimentares são um exemplo da complexidade de comportamentos reológicos, podendo-se encontrar sistemas desde sólidos cristalinos a “líquidos puros”, passando por sistemas de comportamento intermédio como suspensões, emulsões, estruturas tridimensionais semisólidas e sistemas complexos multifásicos.

Embora os comportamentos *hookeano* e *newtoniano* ideais se afastem dos sistemas alimentares reais, as respostas destes materiais ideais podem servir como pontos de referência para a caracterização do comportamento de sistemas alimentares mais complexos.

Os materiais viscoelásticos podem ser sólidos ou líquidos e exibem um comportamento intermédio entre o viscoso e o elástico (figura 1.12). Para que um líquido puramente viscoso flua continuamente, é necessário fornecer energia mecânica ao sistema, a qual é dissipada sob a forma de calor. No caso de um comportamento elástico, um sólido idealmente elástico armazena todo o trabalho (energia) realizado sobre ele durante a deformação, o que lhe permite o regresso instantâneo ao seu estado inicial, após a remoção da força (Launay, 1996). Um material sólido viscoelástico dissipa, sob a forma de calor, parte da energia mecânica que lhe foi fornecida, o que corresponde à existência de uma “viscosidade interna”. Num líquido viscoelástico, parte da energia fornecida é armazenada temporariamente (fluido memória). Fluidos deste tipo produzem o efeito de Weissenberg.

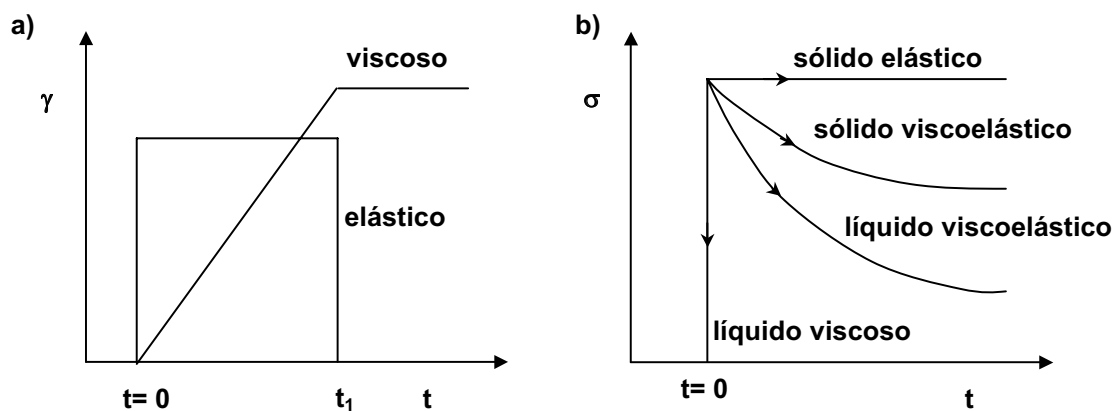


Figura 1.12 - Comportamento viscoelástico, a) deformação em função do tempo após a aplicação de uma tensão constante ($t=0$) e remoção dessa tensão (t_1). b) - Tensão de um material em função do tempo após a aplicação súbita de uma determinada deformação ($t=0$).

Os materiais viscoelásticos são geralmente caracterizados pelos módulos de conservação (G') e de perda (G''). O módulo de conservação representa o carácter elástico do material,

e o módulo de perda representa o carácter viscoso. Estes módulos serão tratados mais detalhadamente na secção I.2.1.2.1.

I. 2.1.2. Estudo do Comportamento Viscoelástico

A caracterização das propriedades reológicas de um material baseia-se na medida da relação entre uma solicitação actuante sobre ele e a resposta à mesma, em função do tempo. A solicitação imposta pode ser uma tensão, uma deformação ou uma taxa de corte, que podem ser mantidas constantes, no caso dos ensaios estáticos e transitórios, ou variáveis, no caso de ensaios dinâmicos, ao longo do tempo.

I. 2.1.2.1. Ensaio Dinâmico

A caracterização do comportamento reológico de materiais viscoelásticos é geralmente realizada através de ensaios dinâmicos oscilatórios. O principal objectivo destes testes consiste em analisar a amostra de uma forma não destrutiva. Neste tipo de ensaios, a amostra é sujeita a uma variação sinusoidal (harmónica) da tensão ou da deformação. Estes ensaios são muito sensíveis a variações na composição química e estrutura física dos materiais em estudo, pelo que se tornam bastante úteis na monitorização de muitos fenómenos como gelatinização e retrogradação do amido, evolução da textura e desnaturação proteica, entre outros. Porém, é muito importante que os ensaios sejam realizados a baixas amplitudes de deformação de forma a não provocar quaisquer alterações indesejáveis na estrutura do material e não produzir falsos resultados. Outra condição importante é a realização dos testes na zona linear, ou seja, na zona em que a razão entre a tensão e deformação, em qualquer tempo ou frequência seja independente da magnitude da tensão ou deformação aplicada.

Nos ensaios de oscilação a amostra é geralmente sujeita a uma deformação de baixa amplitude que varia sinusoidalmente com o tempo:

$$\gamma = \gamma_0 \cos(\omega t) \quad \text{eq. 1.4}$$

onde γ_0 é a amplitude máxima da deformação e ω a frequência (em rad/s) de oscilação.

A taxa de deformação de corte ($\dot{\gamma}$) será a primeira derivada da deformação em relação ao tempo:

$$d\gamma/dt = \dot{\gamma} = \omega \gamma_0 \cos(\omega t) \quad \text{eq. 1.5}$$

Se o material se comportar linearmente, a tensão (σ) resultante seguirá também uma função sinusoidal com a mesma frequência, com um intervalo de tempo suficiente para atingir o estado estacionário:

$$\sigma = \sigma_0 \cos(\omega t + \delta) \quad \text{eq. 1.6}$$

onde σ_0 representa a amplitude máxima da tensão, ω a frequência (rad.s) de oscilação, e δ a diferença de fase entre γ_0 e σ_0 , também conhecido como ângulo de perda mecânica, ou ângulo de fase (δ).

O valor do ângulo de perda depende do carácter viscoelástico da amostra (figura 1.13). Se o material for um sólido elástico ideal, a tensão é directamente proporcional à deformação, pelo que a sinusóide da tensão estará em fase com a sinusóide da deformação, e o ângulo será nulo. Se o material for um líquido viscoso ideal, a tensão é directamente proporcional à taxa de corte ($\dot{\gamma}$), pelo que a sinusóide da tensão estará desfasada da sinusóide da deformação em 90° . Um material viscoelástico apresentará um ângulo de fase entre 0° e 90° , e a tendência para cada um destes limites é um indicador da natureza viscosa ou elástica do material.

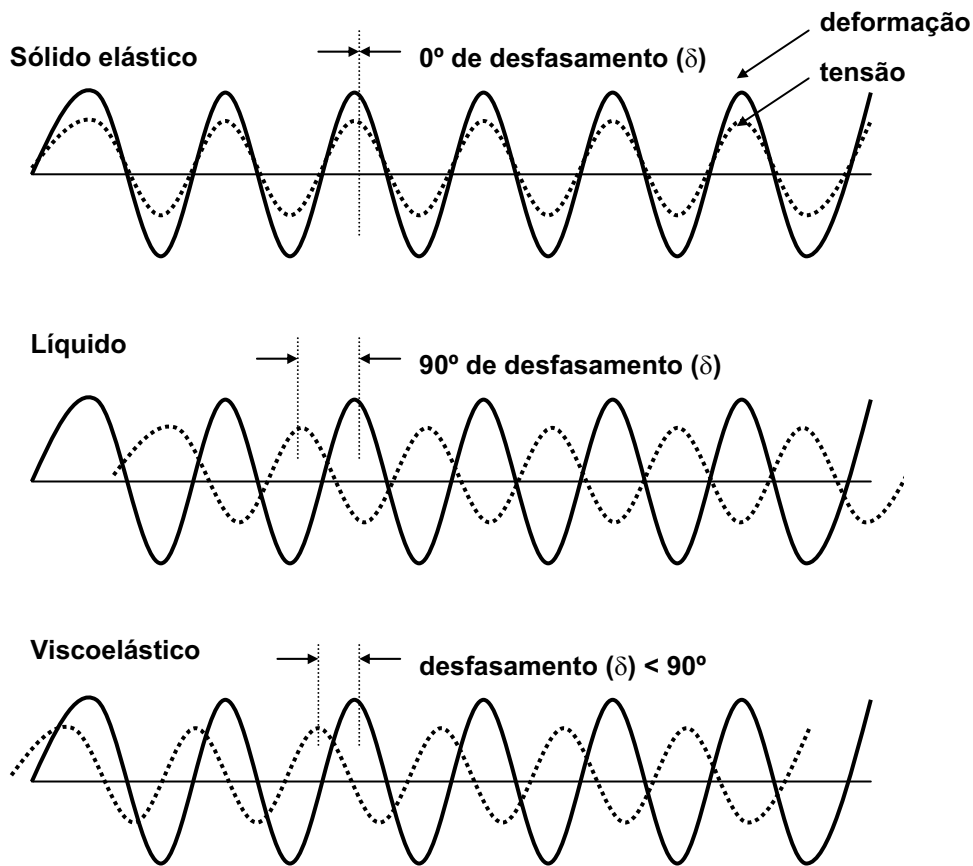


Figura 1.13 - Respostas dinâmicas sinusoidais de sistemas com comportamento elástico, viscoso, viscoelástico. Variação do ângulo de fase ou de perda (δ).

I. 2.1.2.1.1. Módulos viscoelásticos

A razão entre a tensão e a deformação é definida como:

$$\sigma = G^*(\omega) / \gamma_0 \quad \text{eq. 1.7}$$

em que G^* é o módulo complexo e é representado como:

$$G^* = \sigma_0 / \gamma_0 = G' + i G'' \quad \text{eq. 1.8}$$

Na equação equação 1.8 G' representa a componente real e G'' a componente imaginária do módulo complexo. G' é denominado por *módulo de conservação* e mede a energia recuperada por cada ciclo sinusoidal de deformação. G'' , por sua vez, mede a energia

dissipada, sob a forma de calor, por cada ciclo sinusoidal de deformação, e é por isso denominado por *módulo de perda*. O valor absoluto de G^* é dado por:

$$|G^*| = [(G')^2 + (G'')^2]^{1/2} \quad \text{eq. 1.9}$$

G' e G'' são ambas funções de frequência e podem ser expressos em termos da razão de amplitudes e do ângulo de fase:

$$G' = (\sigma_0/\gamma_0) \cos(\delta \text{ ou } \omega t) \quad \text{eq. 1.10}$$

$$G'' = (\sigma_0/\gamma_0) \sin(\delta \text{ ou } \omega t) \quad \text{eq. 1.11}$$

A função da tensão de um material viscoelástico é então composta por uma componente elástica e por uma componente viscosa:

$$\sigma = \gamma_0 [G' \sin(\delta \text{ ou } \omega t) + G'' \cos(\delta \text{ ou } \omega t)] \quad \text{eq. 1.12}$$

A razão entre o módulo de perda e o módulo de armazenamento corresponde à tangente ao ângulo de perda (ou de fase) e dá uma medida da energia que se dissipou relativamente à energia armazenada num ciclo de deformação. Esta razão é denominada por *tangente ao ângulo de perda*:

$$\tan \delta = G'' / G' \quad \text{eq. 1.13}$$

A tangente de perda revela-se bastante útil na caracterização reológica de um sistema pois dá uma indicação sobre as propriedades físicas macroscópicas algumas das quais poderão ser detectadas visualmente.

A viscosidade complexa (η^*) é definida como:

$$\eta^* = \eta' + i \eta'' \quad \text{eq. 1.14}$$

sendo:

$$\eta^* = |G^*| / \omega = [(\eta')^2 + (\eta'')^2]^{1/2} \quad \text{eq. 1.15}$$

onde:

$$\eta' = G' / \omega \quad \text{eq. 1.16}$$

$$\eta'' = G' / \omega \quad \text{eq. 1.17}$$

η' representa a viscosidade dinâmica e, à semelhança do G'' , exprime a contribuição viscosa associada aos efeitos dissipativos da deformação alternada. η'' exprime a contribuição elástica associada à capacidade do material de armazenar energia.

I. 2.1.2.1.2. Alguns tipos de ensaios para medição do comportamento reológico

Nesta secção são explicados os principais ensaios reológicos de realizados no presente trabalho. Os ensaios a seguir referidos estão esquematizados na Figura 1.14.

I. 2.1.2.1.2.1. Varrimento de tensão aplicada

O teste de varrimento de tensão aplicada é realizado quando se pretende determinar os limites de linearidade do comportamento viscoelástico. Neste sentido, é efectuado um varrimento de amplitudes de tensão ou de deformação (Figura 1.14), a uma determinada frequência constante, usando reómetros de tensão controlada ou de taxa de corte controlada, respectivamente. Os ensaios de varrimento de tensão, para além de determinarem limites de linearidade são também utilizados para comparação de materiais em termos de resistência à deformação. Por exemplo, um gel mais forte terá uma região viscoelástica linear de maior amplitude (incluindo valores maiores de deformação) do que um gel mais fraco.

I. 2.1.2.1.2.2. Varrimento de Frequência de oscilação

O varrimento de frequência é o tipo de ensaio mais usado nos testes de oscilação. Através dos ensaios de varrimento de frequência é possível verificar o modo como o comportamento viscoelástico de um material se altera com a taxa de aplicação de uma deformação definida. Nestes ensaios a amplitude de deformação é constante, aumentando apenas a sua frequência de aplicação (Figura 1.14). Os ensaios de frequência são muitas

vezes utilizados para comparar o efeito nas propriedades viscoelásticas resultantes da adição de vários ingredientes, variação de concentrações e variação de processos de tratamento.

1. 2.1.2.1.2.3. Varrimento em Tempo

Os ensaios de varrimento no tempo são utilizados para estudar alterações estruturais dependentes do tempo, geralmente relacionados com relaxação, estabilização ou fortalecimento da estrutura de um material. Nestes ensaios a amplitude de deformação, bem como a frequência da sua aplicação são mantidas constantes ao longo do tempo (Figura 1.14).

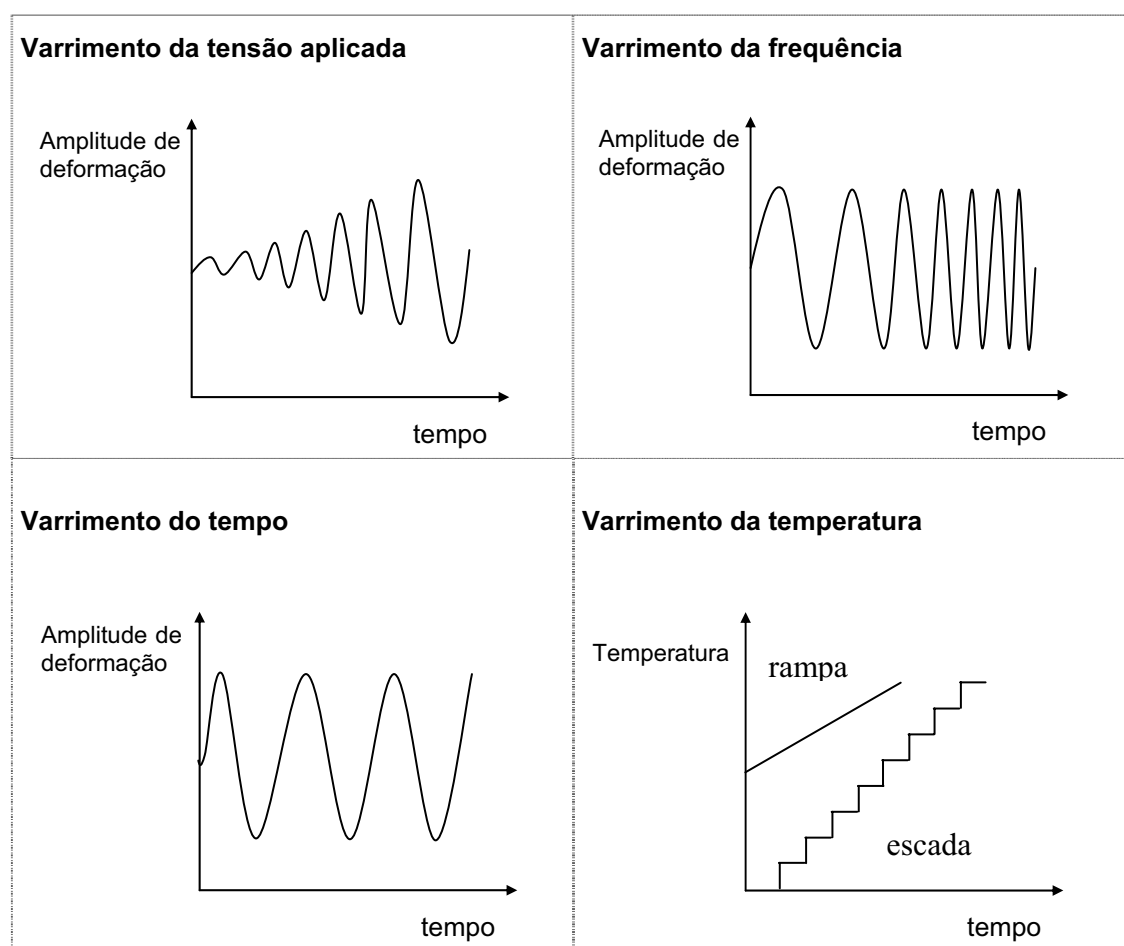


Figura 1.14 - Tipos de ensaios de oscilação utilizados do estudo das propriedades reológicas apresentados neste trabalho (adaptado de Steffe, 1996)

I. 2.1.2.1.2.4. Varrimento da Temperatura

À semelhança do teste de varrimento no tempo, os ensaios de varrimento em temperatura são utilizados para estudar alterações estruturais resultantes da variação da temperatura. Nestes ensaios a amplitude de deformação bem como a frequência da sua aplicação são mantidas constantes ao longo do tempo, apenas variando a temperatura a que decorre o teste de oscilação (Figura 1.14). A variação da temperatura pode ser feita em “escada”, por incrementos de temperatura definidos, ou em “rampa”, por definição de uma taxa de aquecimento/arrefecimento.

I. 2.1.2.2. Ensaios Transitórios

Os ensaios transitórios são geralmente utilizados para caracterizar o comportamento mecânico dos materiais em função do tempo. Os ensaios mais utilizados são os ensaios de fluência (tensão aplicada constante) e ensaios de relaxação de tensão (deformação constante).

I. 2.1.2.3. Ensaios de Escoamento

Nestes ensaios, geralmente usados para a determinação da viscosidade de um sistema, uma taxa de corte ($\dot{\gamma}$) pré-definida é aplicada e a tensão resultante é medida, ou vice-versa. Nos ensaios realizados aplicou-se uma tensão de corte constante e mediu-se a taxa de corte resultante, em função do tempo, como ilustrado na Figura 1.15. Para materiais viscoelásticos, a curva de taxa de deformação ao longo do tempo poderá exibir um pico máximo ao valor γ_y (Figura 1.15). O pico máximo está relacionado com a quebra da

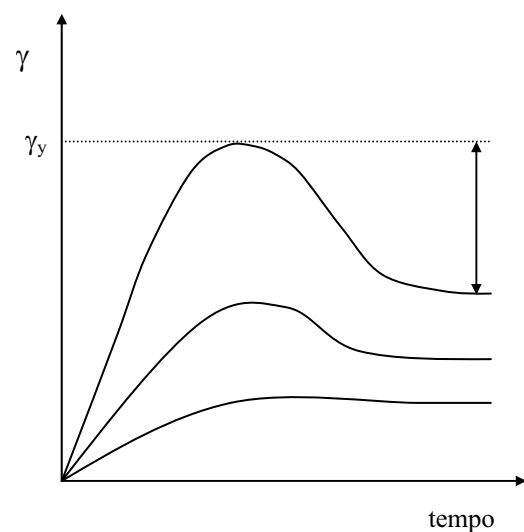


Figura 1.15 - Ensaios de Escoamento

estrutura do material. A continuação da deformação imposta sobre o material leva a uma maior destruição da estrutura e consequente descida do valor da viscosidade aparente (η_a).

I. 2.1.3. Instrumentos de medição do comportamento reológico

A nível industrial, a caracterização reológica das massas de farinha efectua-se recorrendo a métodos de natureza empírica, os quais, geralmente, implicam que a amostra seja sujeita a elevadas amplitudes de deformação, resultando num comportamento tipicamente não-linear. À escala laboratorial, a caracterização das propriedades mecânicas das massas de farinha segue métodos reológicos fundamentais, não destrutivos, realizados a baixa amplitude de deformação e na zona de resposta linear. Os ensaios de reologia fundamental permitem um conhecimento mais profundo da estrutura e interações entre os componentes presentes nas massas de farinha. Os ensaios empíricos, por sua vez, são geralmente usados para o controlo do processo de panificação ou da qualidade da farinha.

Os instrumentos utilizados para o estudo fundamental das propriedades reológicas de sistemas líquidos e /ou semi-sólidos são comumente divididos em duas categorias: os instrumentos rotacionais e os tubulares. Nesta secção apenas será dada atenção particular aos instrumentos utilizados no estudo apresentado na presente dissertação, sendo eles o reómetro de tensão controlada e o viscosímetro capilar.

I. 2.1.3.1. Reómetro de Tensão Controlada

Um reómetro é um instrumento capaz de medir propriedades reológicas. O reómetro de tensão controlada tem a capacidade de actuar nos modos oscilatório e estacionário, mantendo a tensão aplicada constante. A possibilidade de aplicação de momentos de binário (torque) muito reduzidos e a medição de deslocamentos igualmente muito pequenos, possibilita a realização de ensaios a baixas taxas de deformação, evitando alterações indesejáveis nos materiais em estudo, promovendo o conhecimento da sua estrutura interna.

O sistema de medida do reómetro utilizado neste trabalho é equipado por um sistema de peças de diferentes geometrias, sendo constituído por duas partes principais: uma placa estacionária, que incorpora o sistema de controlo de temperatura (sistema Peltier), e um

componente móvel de geometria variável, associado a um eixo e motor que permite o movimento rotacional deste componente (Figura 1.16).

As geometrias usadas são geralmente construídas em aço-inox, alumínio ou acrílico. O tipo de material utilizado terá que ser escolhido de acordo com o tipo de ensaio e tipo de amostra a estudar. Deverá sobretudo ter um efeito inerte no estudo, quer do ponto de vista químico quer do ponto de vista físico.

O componente móvel (eixo + geometria) deve ser o mais leve possível para minimizar efeitos de inércia. A escolha da geometria a utilizar depende do tipo de sistema que se pretende estudar. Os sistemas utilizados neste estudo foram as geometrias placa-cone e placa-placa (ou placas paralelas), a quais são descritas a seguir, mais detalhadamente.

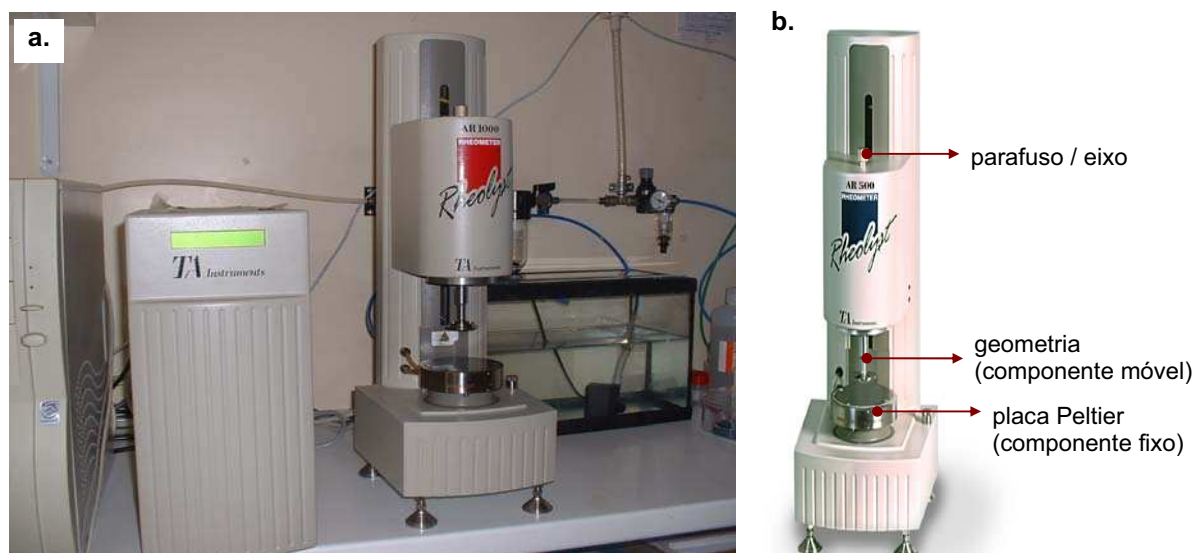


Figura 1.16 - a)- O reómetro AR-1000 da TA Instruments (New Castle, DE) utilizado no estudo das propriedades reológicas apresentado neste trabalho; b)- composição do sistema de medida do reómetro

I. 2.1.3.1.1. *Geometria placa-cone*

A geometria placa-cone (Figura 1.17) é geralmente usada para sistemas homogêneos líquidos ou sistemas constituídos por partículas de tamanhos inferiores a 1 μm . Existem cones de vários diâmetros e ângulos de inclinação.

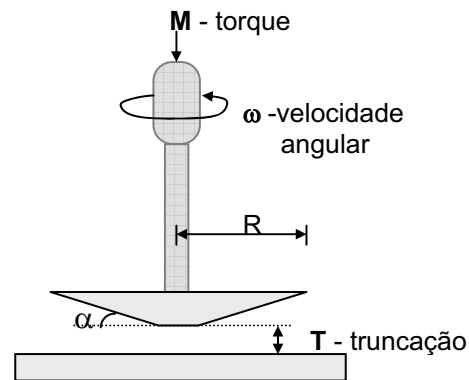


Figura 1.17 - Geometria placa-cone utilizada na medição das propriedades reológicas fundamentais em ensaios de oscilação dinâmica

I. 2.1.3.1.2. **Geometria placa-placa**

A geometria placa-placa (Figura 1.18) é mais usada para sistemas semi-sólidos constituídos por partículas na ordem dos microns.

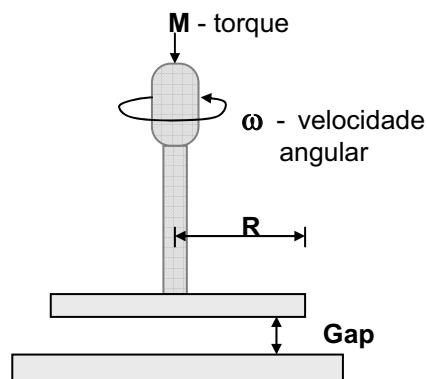


Figura 1.18- Geometria placa-placa utilizada na medição das propriedades reológicas fundamentais em ensaios de oscilação dinâmica

A distância de separação entre a placa superior (móvel) e a inferior (fixa) é conhecida como “gap” e pode ser ajustado de acordo com as amostras em estudo. O valor do gap deverá ser cerca de dez vezes superior ao tamanho médio das partículas da amostra. A maior desvantagem da geometria placa-placa reside no facto de a tensão aplicada não ser

uniforme por toda a amostra. Porém, este efeito é minimizado e compensado pelo software do aparelho.

I. 2.1.3.2. Viscosímetro Capilar

Um viscosímetro é um aparelho que serve apenas para medir a viscosidade de soluções diluídas. Os viscosímetros capilares são indicados para determinar a viscosidade de fluidos Newtonianos com viscosidades na gama 0.4 a 20000 mPa s. O princípio de funcionamento destes viscosímetros baseia-se na acção da força gravítica sobre o líquido viscoso, embora alguns aparelhos estejam acoplados a motores de aumento de pressão para o estudo de valores de viscosidade mais elevados. O viscosímetro usado no presente trabalho foi o do tipo Cannon-Fenske, que pertence ao tipo de viscosímetros em forma de “U”.

Através dos viscosímetros capilares é possível determinar o valor da viscosidade intrínseca de soluções de polímeros diluídas. Considerando que uma solução é constituída pelo soluto (polímero) e pelo solvente, a viscosidade relativa é obtida pela relação entre a viscosidade da solução ($\eta_{\text{solução}}$) e viscosidade do solvente (η_{solvente}) respectivo, medidas nas mesmas condições de temperatura:

$$\eta_{\text{rel}} = \eta_{\text{solução}} / \eta_{\text{solvente}} \quad \text{eq. 1.18}$$

A viscosidade específica (η_{sp}) é dada por:

$$\eta_{\text{sp}} = \eta_{\text{rel}} - 1 \quad \text{eq. 1.19}$$

A viscosidade intrínseca ($[\eta]$) é dada por:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{\text{sp}} / C) \quad \text{eq. 1.20}$$

onde C representa a concentração mássica da solução em g/dl.

Na determinação da viscosidade intrínseca, são geralmente utilizadas duas equações, a equação de Huggins (1942) e a equação de Kraemer (1938):

$$\text{eq. Huggins: } \frac{\eta_{\text{sp}}}{C} = [\eta] + k' \times [\eta]^2 \times C \quad \text{eq. 1.21}$$

$$\text{eq. Kraemer:} \quad \ln \left(\frac{\eta_{\text{rel}}}{C} \right) = [\eta] - k'' \times [\eta]^2 \times C \quad \text{eq. 1.22}$$

onde:

η_{sp} - viscosidade específica

η_{rel} - viscosidade relativa

C - concentração do soluto

$[\eta]$ - viscosidade intrínseca

k' - coeficiente de Huggins

k'' - coeficiente de Kraemer

$[\eta]$ é determinada por extrapolação, quando $C \rightarrow 0$.

A viscosidade intrínseca é um parâmetro bastante importante pois dá uma ideia sobre o volume hidrodinâmico do polímero. Em soluções diluídas, as cadeias dos polímeros estão separadas, pelo que a viscosidade intrínseca de um polímero em solução depende apenas das dimensões (massa molecular, conformação) das cadeias dos polímeros.

A viscosidade intrínseca é uma indicação do volume hidrodinâmico da molécula e está relacionada com a massa molecular e com a conformação da macromolécula, pelo que pode ser utilizada como uma medida da massa molecular viscosimétrica de polímeros através da relação de Mark-Houwink (eq.1.23):

$$[\eta] = k M_w^a \quad \text{eq. 1.23}$$

onde:

$[\eta]$ - viscosidade intrínseca

k - constante

M_w - massa molecular

a - grandeza escalar que relacionada com o tipo de estrutura do polímero

Na equação 1.23, k e a são constantes determinadas a uma temperatura específica e para um determinado par soluto-solvente. Estas constantes variam de acordo com as características próprias quer do polímero quer do solvente.

I. 2.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica bastante poderosa para a investigação da estrutura e processos moleculares. Em RMN, por aplicação de um campo magnético, faz-se o estudo das propriedades de moléculas que contêm núcleos magnéticos, observando-se a frequência à qual esses núcleos entram em ressonância com o campo oscilatório electromagnético. Na espectroscopia de RMN, as frequências dos núcleos nos campos normalmente usados caem na região da rádio frequência (na ordem dos MHz) do espectro electromagnético. Quando aplicada a spins de protão, a técnica chama-se RMN de protão (^1H -RMN). Quando aplicada a spins de carbono-13, a técnica chama-se RMN de carbono-13 (^{13}C -RMN).

O núcleo de um átomo é caracterizado pela sua massa, carga e número de spin. O *número quântico de spin*, I , de um núcleo pode assumir um valor inteiro, semi-inteiro ou zero ($I = 0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, 2, \dots$). Núcleos com $I > 0$ apresentam propriedades magnéticas e isótopos do mesmo elemento podem ter diferente número de spin. O número quântico de spin de um núcleo é determinado sobretudo pelo número de protões e neutrões emparelhados (momento angular de spin total). Em muitos átomos (tal como ^{12}C), estes spins estão emparelhados um contra o outro, de modo que o núcleo do átomo possui um número de spin total nulo. Porém, noutros átomos, tais como ^1H e ^{13}C , o núcleo possui um número de spin total não nulo, apresentando assim propriedades magnéticas.

I. 2.2.1. Interações de spin nuclear

A informação fornecida pela espectroscopia de RMN depende de vários factores tais como a espécie do núcleo em estudo, o ambiente electrónico que rodeia o núcleo e a posição que esse núcleo ocupa numa molécula. No estado sólido, os núcleos dos vários elementos encontram-se mais próximos uns dos outros os quais podem interagir entre si. Quando um núcleo magnético é sujeito a um campo magnético externo, as principais interações que podem ocorrer são (Fyfe, 1983):

1. A interação de Zeeman (Z) com o campo magnético, a qual ocorre em todos os núcleos com números de massa e atómico ímpares, estabelecendo-se entre um campo

magnético estático, B_0 , e o momento magnético, μ , de um núcleo, resultando na deslocação da energia do núcleo para níveis superiores.

2. A interacção dipolo-dipolo (D) que ocorre devido à presença de duas espécies magnéticas diferentes presentes na amostra, o que pode resultar na alteração das frequências ou intensidades dos espectros de RMN. No caso de sistemas líquidos (soluções), os movimentos moleculares são isotrópicos e bastante mais rápidos quando comparados com as interacções dipolares (na escala de tempo em que decorre a experiência de RMN), pelo que as interacções dipolares não afectam as frequências ou intensidades dos espectros de RMN de líquidos. No caso de sistemas sólidos, uma vez que não existem movimentos moleculares livres, as interacções dipolares têm um efeito médio não nulo, o que resulta num forte alargamento de banda no espectro de RMN.
3. A interacção de desvio químico (DQ) que deriva do efeito de protecção (“shielding”) do núcleo devido à densidade da nuvem electrónica envolvente. Em RMN de ^{13}C de sólidos, as magnitudes das interacções de desvio químico são da ordem das centenas de ppm (250 ppm), e podem variar significativamente entre os diferentes tipos de carbono. Em RMN de ^1H , a gama de desvios é muito pequena, na ordem dos 10 ppm.
4. A interacção de acoplamento escalar de spins (J) que resulta do efeito da interacção entre os núcleos e os electrões das ligações. Ocorre sobretudo em RMN de líquidos e resulta na divisão das linhas de RMN num pequeno número de componentes com espaçamentos e intensidades relativas características de cada tipo de interacção.
5. A interacção quadrupolar (Q) ocorre para núcleos de $\text{spin} > \frac{1}{2}$, como por exemplo ^2H , ^{17}O , e ^{27}Al que se comportam como uma distribuição da carga eléctrica não-esférica, apresentando um momento quadrupolar eléctrico, eQ . A interacção quadrupolar deriva da interacção entre o momento quadrupolar eléctrico com o gradiente de campo não-esférico em redor do núcleo.

O efeito global destas interacções é geralmente descrito por um operador Hamiltoniano total, \hat{H} , que pode ser decomposto numa soma de vários Hamiltonianos correspondentes a cada uma das interacções atrás referidas:

$$\hat{H} = \hat{H}_Z + \hat{H}_D + \hat{H}_{DQ} + \hat{H}_J + \hat{H}_Q \quad \text{eq. 1.24}$$

As diferentes interacções apresentam magnitudes diferentes cujos valores típicos são apresentados na tabela 1.3.

Tabela 1.3 - Magnitudes aproximadas das diferentes interacções de spin (adaptado de Fyfe, 1983)

Tipo de Interação	Magnitude em Hz
Zeeman	$10^6 - 10^9$
Dipolo-dipolo	$0 - 10^5$
Desvio químico	$0 - 10^5$
Acoplamento escalar	$0 - 10^4$
Quadrupolar	$0 - 10^9$

A importância das interacções de spin depende do núcleo a observar e do sistema em estudo. No estado sólido, as interacções são afectadas pelo grau de organização e pelo movimento molecular do sistema. As características do espectro são determinadas por um ou dois dos hamiltonianos correspondentes às interacções individuais, e que dominam o hamiltoniano total. Em RMN de sólidos, estas interacções são anisotrópicas, isto é, são dependentes da orientação, devido às orientações relativamente fixas das moléculas. Em RMN de líquidos, as interacções são o resultado de uma média, dada a velocidade e a isotropia dos movimentos moleculares em solução. Por esta razão, as interacções dipolo-dipolo e quadrupolares não são observadas em RMN de líquidos, uma vez que a média das várias interacções é igual a zero (Fyfe, 1983; Gil e Geraldès, 1987).

I. 2.2.2. Momento magnético, campo magnético e precessão nuclear

Os núcleos magnéticos possuem um momento angular de spin, **a**. O momento angular de spin é um vector de quantidade, ou seja, a sua direcção e magnitude é quantificada. O momento angular de um núcleo tem apenas $\{2I+1\}$ projecções num eixo escolhido arbitrariamente (eixo z). Na ausência de um campo magnético externo, estas orientações são de energia igual, e o momento angular de spin não tem qualquer direcção preferida. Se

um campo magnético é aplicado, então os níveis de energia separam-se. A cada nível é dado um *número quântico magnético*, m_I , e a componente z de \mathbf{a} , denotada por a_z , é quantificada:

$$a_z = m_I (h/2\pi) \quad \text{eq. 1.25}$$

em que m_I , o número quântico magnético, tem $2I + 1$ valores em intervalos integrais entre $+I$ e $-I$:

$$m = I, I-1, I-2, \dots, -I, -I+1, I.$$

Os núcleos como ^1H e ^{13}C têm spin $\frac{1}{2}$ e quando sujeitos a um campo magnético externo poderão apresentar duas orientações possíveis: $m = -1/2$ e $m = +1/2$ (figura 1.19a). O estado com $m = +1/2$ é denominado estado alfa (α) e o estado com $m = -1/2$ é denominado estado beta (β). Núcleos com spin=1, poderão apresentar três orientações possíveis: $m = -1$, $m = 0$ e $m = +1$ (figura 1.19b).

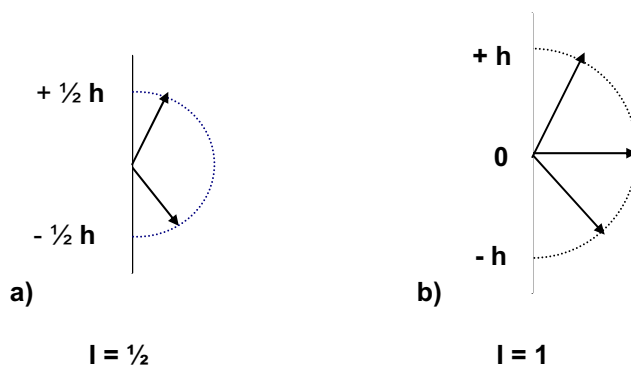


Figura 1.19 - Orientações possíveis dos vectores momento angular de núcleos com a) spin $I = 1/2$ e b) $I = 1$

O momento magnético de um núcleo está intimamente ligado ao seu momento angular de spin. O momento magnético, μ (também uma quantidade vectorial), é directamente proporcional a \mathbf{a} , com a constante de proporcionalidade γ (a razão magnetogírica):

$$\mu = \gamma \mathbf{a} \quad \text{eq. 1.26}$$

A razão magnetogírica é uma medida da sensibilidade de um núcleo em espectroscopia de RMN. O núcleo ^1H com $\gamma = 2,67519 \times 10^8 \text{ rad}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$, apresenta uma sensibilidade

relativamente elevada, e mais elevada do que o núcleo ^{13}C , com $\gamma = 0,6728367519 \times 10^8 \text{ rad}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$ (Gil e Geraldès, 1987).

Substituindo I pela expressão da eq. 1.25, obtém-se:

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma (h/2\pi) m_I \quad \text{eq. 1.27}$$

A energia de um momento magnético $\boldsymbol{\mu}$, num campo magnético \mathbf{B}_0 é:

$$E = -\boldsymbol{\mu} \mathbf{B} \quad \Leftrightarrow \quad E = -\mu_z \mathbf{B}_0 \quad \Leftrightarrow \quad E = -\gamma (h/2\pi) m_I \mathbf{B}_0 \quad \text{eq. 1.28}$$

onde μ_z é a componente z de $\boldsymbol{\mu}$ (projectão de $\boldsymbol{\mu}$ em \mathbf{B}_0) e \mathbf{B}_0 é a força do campo magnético (magnitude de \mathbf{B}_0).

Quando um núcleo é colocado num campo magnético, a energia do núcleo é deslocada por uma quantidade proporcional à força do campo magnético, à razão magnetogírica, e à componente z do momento angular. Em RMN apenas interessam transições entre níveis de energia adjacentes, ou seja, $\Delta m = \pm 1$. A diferença de energia entre os dois estados α e β em núcleos de spin $-1/2$ é dada por $\Delta E = \gamma (h/2\pi) \mathbf{B}_0$ (Figura 1.20).

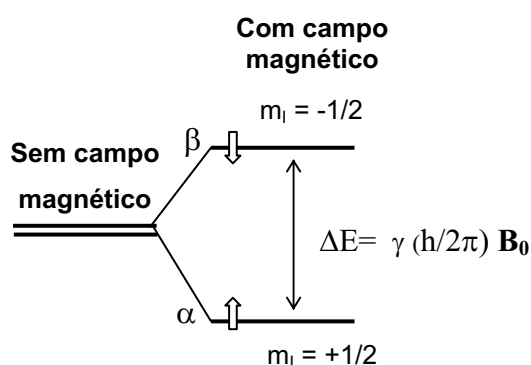


Figura 1.20- Separação dos níveis de energia de spin por acção de um campo magnético externo

A separação entre dois níveis de energia spin é uma função do ambiente molecular do núcleo numa molécula (átomos de hidrogénio em diferentes ambientes químicos absorvem

fotões com diferentes energias). Representando a quantidade da energia absorvida pelos núcleos spin em função da frequência da radiação aplicada à molécula, obtém-se o espectro de ressonância nuclear da molécula. Este espectro dá-nos informação sobre o ambiente químico do núcleo spin de protão, e pode ser usado para deduzir os tipos de ligações atómicas numa molécula.

A absorção global de energia, e portanto a intensidade da transição espectroscópica, está dependente da diferença de populações entre os dois estados (α e β). As populações iniciais dos níveis de energia são determinadas pela termodinâmica, segundo a distribuição de Boltzmann. A razão de populações nos dois níveis é:

$$N_{\text{superior}} / N_{\text{inferior}} = e^{(-\Delta E / kT)} \approx 1 - \Delta E / kT \quad \text{eq. 1.29}$$

em que :

$$\Delta E = (h/2\pi) \gamma B \quad e \quad k - \text{constante de Boltzmann}$$

A intensidade do sinal depende da diferença de população entre os dois níveis envolvidos. Uma maior diferença entre as populações resulta no aumento da razão sinal/ruído do espectro (Gil e Gerald, 1987; Harris, 1986). O efeito dos spins no estado de energia mais elevado é cancelado pelos spins opostos no nível energético mais baixo, e somente um ligeiro excesso de spins no estado mais baixo de energia (ΔN) é responsável pela absorção da radiação e, portanto, pelo sinal detectável em espectroscopia de RMN. Por exemplo, para um núcleo de ^1H num campo magnético de 9.4 T (frequência 400 MHz) a 300K, $\Delta N/N \approx 10^{-5}$. Esta baixa sensibilidade intrínseca da espectroscopia de RMN é frequentemente agravada pela baixa abundância natural de certos isótopos como o ^{13}C (~1%)

A interacção entre o campo magnético \mathbf{B}_0 e o momento magnético nuclear $\boldsymbol{\mu}$ pode ser descrita em termos de um torque exercido em $\boldsymbol{\mu}$ e perpendicular ao plano definido por \mathbf{B}_0 e $\boldsymbol{\mu}$, cujo efeito resultante corresponde a uma rotação (ou precessão) de $\boldsymbol{\mu}$ num cone em torno de \mathbf{B}_0 (figura 21a) A frequência angular da precessão é denominada como frequência de Larmor, ω_L , e é directamente proporcional a \mathbf{B}_0 :

$$\omega_L = \gamma B_0 \quad \text{eq. 1.30}$$

Quanto mais forte for o campo magnético maior é a frequência de Larmor. Um campo com 12 Tesla corresponde a uma frequência de cerca 500 MHz para os núcleos ^1H .

A soma de todos os momentos magnéticos individuais origina o momento magnético total ou magnetização total, \mathbf{M}_0 , o qual alinha com \mathbf{B}_0 (Figura 1.21b) devido à distribuição aleatória dos momentos angulares de spin em torno de \mathbf{B}_0 .

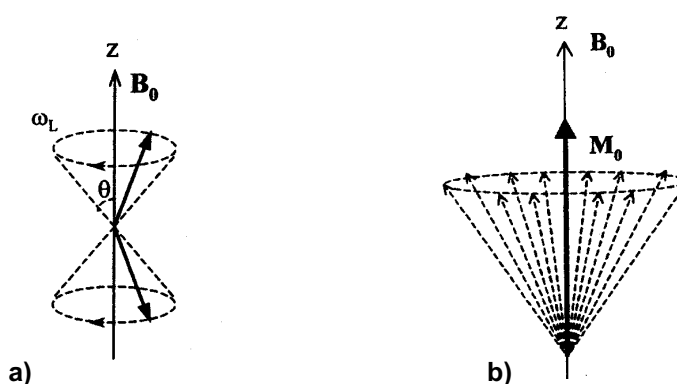


Figura 1.21 - a)- Precissão do momento magnético nuclear ($I=1/2$) em torno do campo aplicado \mathbf{B}_0 ; b)- Magnetização total, \mathbf{M}_0 , resultante do excesso de núcleos no estado de spin menos energético.

I. 2.2.3. Relaxação e Dinâmica Molecular

Tal como já foi referido, quando um núcleo é exposto a uma radiação com uma frequência adequada, durante um certo tempo, os spins nucleares são elevados de um nível de energia inferior para um nível de energia superior e o vector de magnetização total, \mathbf{M}_0 , desvia-se do campo aplicado, \mathbf{B}_0 (Figura 1.22). O vector \mathbf{M}_0 pode ser orientado segundo os eixos +y ou -z, sendo os pulsos de radiofrequência denominados por pulso de 90° e pulso de 180° , respectivamente.

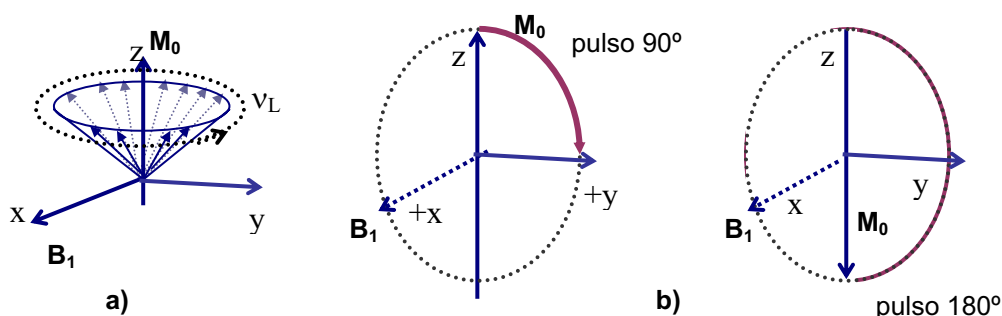


Figura 1.22 - Representação esquemática de a) vector de magnetização total, \mathbf{M}_0 , sob condições de equilíbrio, b) efeito de um pulso de 90° ou de 180° no vector \mathbf{M}_0 .

Logo que a radiação incidente é desligada, o vector \mathbf{M}_0 regressa à sua direcção e intensidade inicial, \mathbf{M}_0 . O excesso de energia dissipa-se no ambiente envolvente através de meios diferentes, até que o sistema retorne novamente ao estado de equilíbrio. Este processo de recuperação do estado de equilíbrio é denominado por *relaxação*, e conduz ao decaimento do sinal de RMN com o tempo (Figura 1.23), produzindo o observado sinal FID ou do *decaimento livre da indução* (do inglês Free Induction Decay). A transformada de Fourier (TF) do sinal FID (domínio no tempo) produz o espectro de RMN (domínio na frequência).

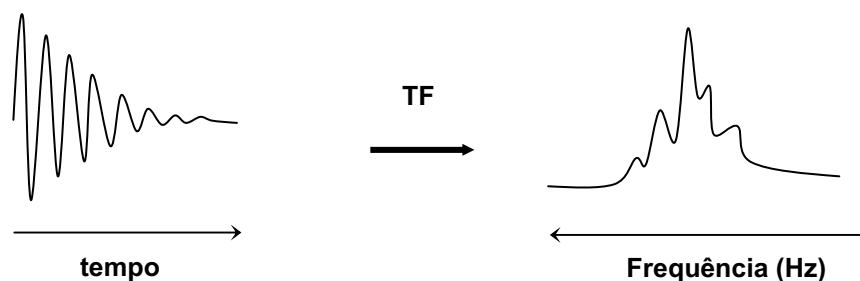


Figura 1.23 - Transformada de Fourier do sinal FID para o correspondente espectro de RMN

Existem vários mecanismos através dos quais a energia pode ser dissipada, entre os quais se encontram os dois processos de relaxação - relaxação spin-rede ou longitudinal (T_{1H}) e relaxação spin-spin ou transversal (T_{2H}) - que permitem que os spins nucleares regressem ao equilíbrio após um certo tempo de desequilíbrio. A relaxação longitudinal converte o excesso de energia em energia translacional, rotacional e vibracional dos átomos e moléculas circundantes. A relaxação transversal transfere o excesso de energia a outros núcleos na amostra. Existe ainda um terceiro tipo de relaxação, a relaxação longitudinal do referencial rotativo, caracterizada pelo tempo de relaxação $T_{1\rho}$. Este tempo de relaxação não será aqui explicado, dado que não foi um parâmetro utilizado neste trabalho.

A posição de um sinal de RMN é medida pela frequência de ressonância de um núcleo, expressa em Hertz (Hz). Este valor é uma característica do ambiente químico do núcleo em estudo e é proporcional à força do campo magnético, dependendo grandemente na frequência de operação do espectrómetro. De modo a ultrapassar este inconveniente, a escala de frequência é calibrada através do recurso a um composto de referência. Para o próton (1H) e para o carbono-13 (^{13}C) o composto de referência normalmente utilizado é o tetrametilsilano, $Si(CH_3)_4$, vulgarmente conhecido como TMS, que é uma substância inerte, solúvel na maioria dos solventes orgânicos, e dá uma ressonância única e forte dos seus 12 prótons idênticos.

O desvio químico de um núcleo é a diferença entre a frequência de ressonância de um núcleo em questão e a do padrão. Os desvios químicos são registados na *escala* δ , que é definida como:

$$\delta = 10^6 (v - v_{ref})_{Hz} / v_{ref}Hz \quad \text{eq. 1.31}$$

onde v é a frequência de ressonância do sinal do núcleo em estudo na amostra, e v_{ref} é a frequência de ressonância do padrão. O desvio químico δ é apresentado em unidades de ppm e é assim independente do campo aplicado, pois ambos o numerador e denominador são proporcionais ao campo aplicado, e a sua razão anula o efeito.

I. 2.2.3.1. Teoria da relaxação

A relaxação é induzida por campos magnéticos internos flutuantes criados por movimentos Brownianos. Os processos de relaxação estão relacionados com a dinâmica do sistema e caracterizam-se na escala temporal pelo tempo de correlação, τ_c , definido como sendo o tempo médio entre colisões moleculares para uma molécula num dado estado de movimento, ou seja, o tempo médio necessário para uma molécula alterar a sua orientação (Fyfe, 1983; Harris, 1986; Gil e Geraldés, 1987). Os tempos de relaxação T_{1H} e T_{2H} dependem da densidade espectral, $J(\omega)$, definida como a intensidade de colisões moleculares a uma determinada frequência, ω , dependendo portanto de τ_c . A variação da densidade espectral com a frequência está ilustrada na Figura 1.24a. Sistemas com grande mobilidade molecular ($J(\omega)$ mais baixo), tais como grupos metilo ou aromáticos, apresentam tempos de correlação curtos, e envolvem processos de frequências elevadas (centenas de MHz) dependentes de $J(\omega_0)$ e $J(2\omega_0)$. Sistemas mais rígidos ($J(\omega)$ mais elevado), tais como longas cadeias estruturais ou grupos com mobilidade restrita, apresentam valores τ_c mais longos e são dependentes de baixa frequência ($J(0)$).

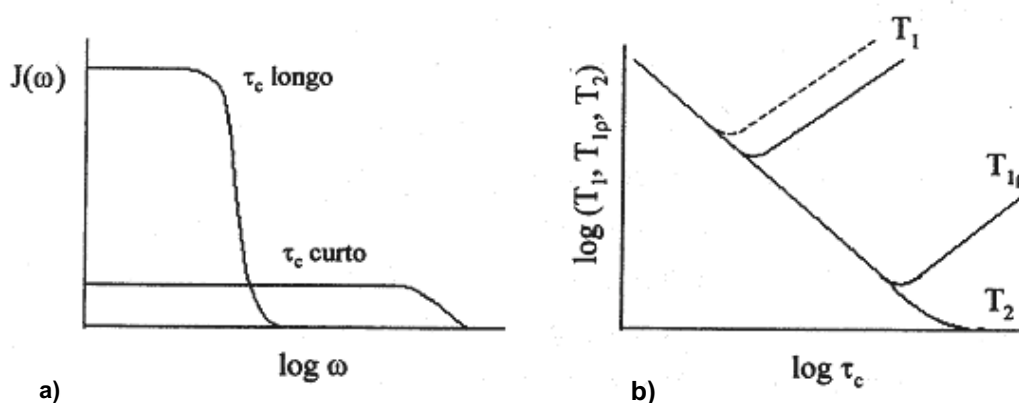


Figura 1.24- Representação esquemática da a)- dependência da densidade espectral $J(\omega)$ com a frequência angular ω para tempos de correlação longos e curtos e b)- variação de T_1 , $T_{1\rho}$ e T_2 com o tempos de correlação τ_c , considerando apenas relaxação dipolar (a linha a tracejado representa o efeito do aumento da magnitude de B_0 em T_1)

A variação dos valores T_{1H} e T_{2H} com o tempo de correlação está ilustrada na Figura 1.24b. Em condições de tempos de correlação curtos (maior mobilidade), T_{1H} e T_{2H} diminuem com o aumento de τ_c , devido à redução ou ausência de movimentos Brownianos. O valor de T_{1H} correspondente ao valor mínimo aumenta com o aumento da força do campo magnético B_0 , tal como indicado pela linha a tracejado. Para tempos de correlação longos (maior rigidez), T_{1H} aumenta linearmente com τ_c , enquanto que T_{2H} diminui. Assim, a partir dos valores de T_{1H} e T_{2H} obtidos, é possível obter informação sobre o tipo de movimentos moleculares presentes na amostra.

Para muitos líquidos, os valores de T_{1H} e T_{2H} são aproximadamente iguais. Em sólidos, os movimentos moleculares não são isotrópicos e frequentemente ocorrem vários movimentos independentes com energias de activação diferentes, pelo que terão o seu efeito máximo em T_{1H} a diferentes temperaturas. Para sólidos cristalinos ou líquidos viscosos, os valores de T_{2H} são muito pequenos, na ordem dos 10^{-4} s.

I. 2.2.3.2. Medição dos tempos de relaxação

O processo de relaxação spin-rede é um processo de primeira ordem que é causado pela flutuação de campos magnéticos que induzem os núcleos a “saltarem” entre os seus estados de spin disponíveis, envolvendo essencialmente a transferência de energia entre os spins e o meio circundante ou “rede”. Este processo é caracterizado pelo tempo de relaxação T_{1H} e é uma função exponencial descrita pela seguinte equação:

$$M_z(t) - M_0 = [M_z(0) - M_0] \exp(-\tau / T_{1H}) \quad \text{eq. 1.32}$$

onde M_0 é a magnetização total no equilíbrio, $M_z(0)$ é a componente da magnetização segundo o eixo z após um pulso e $M_z(t)$ é a componente da magnetização segundo o eixo z após um intervalo de tempo τ que segue o impulso.

O tempo de relaxação, T_{1H} (o tempo médio de núcleos no estado superior de energia) é dependente da razão magnetogírica do núcleo e da mobilidade da rede. À medida que a mobilidade aumenta, as frequências de vibração e rotação aumentam, aumentando a probabilidade de um componente do campo de rede interagir com os núcleos excitados. Porém, para mobilidades extremamente altas, a probabilidade de um componente do

campo de rede interagir com núcleos excitados diminui. Os valores de T_{1H} são assim sensíveis às separações internucleares, e portanto, reflectem a estrutura molecular. Em sólidos cristalinos e em líquidos viscosos, onde as mobilidades são muito baixas, T_{1H} é longo. À medida que a mobilidade aumenta (por aumento da temperatura, por exemplo), as frequências de vibração de rotação aumentam e, conseqüentemente, T_{1H} torna-se mais curto.

O tempo de relaxação longitudinal pode ser medido através do método *Inversão-recuperação* (Vold *et al.*, 1968) cuja sequência é representada por:

$$[180^\circ_x - \tau - 90^\circ_x - t_a - t_d]_n \quad \text{com } t_a + t_d \geq 5 T_{1\max} \quad \text{eq. 1.33}$$

Segundo este método, primeiramente procede-se à inversão da magnetização por aplicação de um pulso de 180° . O vector \mathbf{M}_0 alinha-se segundo o eixo z negativo. Após um certo período de tempo τ , o vector \mathbf{M}_0 recupera exponencialmente a sua posição segundo o eixo z. O valor da magnetização longitudinal $\mathbf{M}_z(\tau)$ é observado por meio de um impulso de 90°_x , aplicado após o lapso de tempo τ . Se \mathbf{M}_0 ainda não tiver atingido a origem e estiver ainda alinhado segundo o eixo z, então \mathbf{M}_z rodará no eixo xy, originando um sinal negativo após transformada de Fourier (Figura 1.25). Por outro lado, se a recuperação da magnetização for suficientemente rápida de modo a alinhar-se segundo o eixo z positivo, então um sinal positivo é obtido.

O tempo de espera (t_d - “delay time”) entre duas sequências (novo pulso 180°) deverá ser pelo menos 5 vezes superior ao valor máximo de T_{1H} , de modo a permitir a recuperação completa da magnetização. Para que se possam obter resultados precisos, é necessário dispor de espectros para valores de τ na gama $0.3-1.5 T_{1H}$ (Gil e Geraldès, 1987; Harris, 1986). Os valores de T_{1H} são depois calculados por ajuste semilogarítmico ou exponencial das intensidades $I(\tau)$ dos picos do espectro registadas, versus o tempo de contacto (τ):

$$I(\tau) = I(\infty) [1 - 2\exp(-\tau / T_1)] \quad \text{eq. 1.34}$$

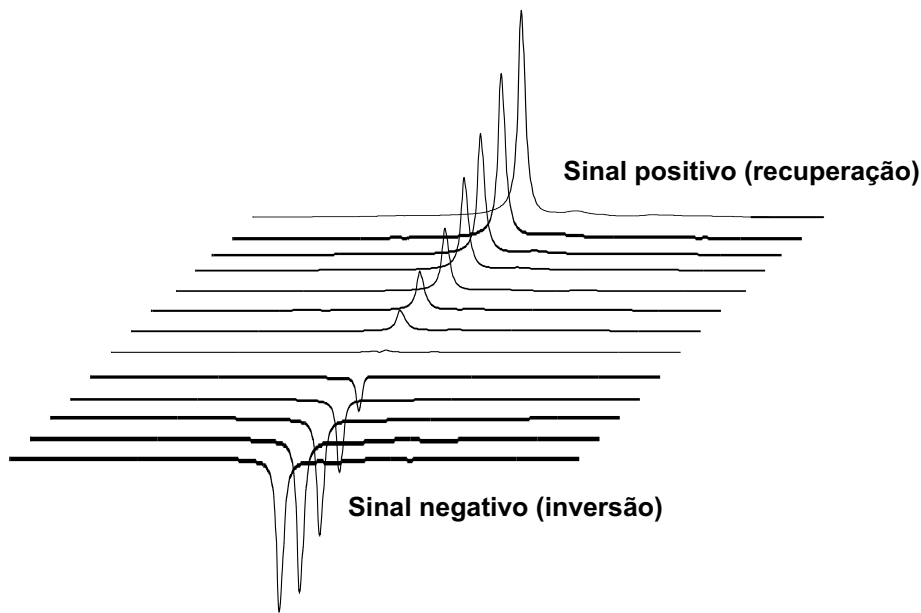


Figura 1.25 - Conjunto de espectros obtidos ao longo de uma experiência de medição do tempo de relaxação longitudinal, através do método inversão-recuperação

O processo de relaxação spin-spin é caracterizado por um tempo de relaxação, T_{2H} , e é descrito pela seguinte expressão exponencial:

$$M_y(t) = M_y(0) \exp(-\tau / T_2) \quad \text{eq. 1.35}$$

onde $M_y(0)$ é a componente da magnetização segundo o eixo y após a aplicação de um pulso, e $M_y(t)$ é a componente da magnetização segundo y após um intervalo de tempo τ que segue o impulso. Neste tipo de relaxação, dois processos ocorrem após a aplicação de um impulso de 90° . Primeiro, devido à não-homogeneidade do campo (núcleos em partes diferentes da amostra experimentam valores ligeiramente diferentes de \mathbf{B}_0) os spins precessam no plano xy (plano transversal) a diferentes velocidades. O vector de magnetização é maior quando os spins estão agrupados imediatamente após um pulso de 90° . Porém, este agrupamento de spins não está em equilíbrio. Os spins alinham-se aleatoriamente em diferentes direcções e a magnetização \mathbf{M}_y decai para zero a uma constante temporal T_2 , sendo $T_2 < T_{2H}$. Depois, determinados processos aleatórios tendem a

realinhar os núcleos de modo a restabelecer o equilíbrio de Boltzmann. O tempo necessário para a re-orientação relativa dos spins é determinado pelo tempo de relaxação T_{2H} .

O tempo de relaxação T_{2H} pode ser determinado usando o método de *Carr-Purcell-Meibom-Gill* (CPMG) (Carr e Purcell, 1954; Meiboom e Gill, 1958) geralmente descrito pela sequência de impulsos seguinte:

$$90^{\circ}_{+x} [\tau - 180^{\circ}_{+y} - \tau - \text{echo}]_n \quad \text{eq. 1.36}$$

Um pulso inicial 90°_x alinha a magnetização total \mathbf{M}_0 na direcção $+y$. Devido à não-homogeneidade do campo de rede, os vectores de magnetização perdem a coerência de fase da magnetização e o sinal decai. Um pulso de 180° na direcção $+y$ é aplicado durante um lapso de tempo 2τ (a contar do pulso inicial) com o efeito de refocar o vector de magnetização (todos os vectores de magnetização giram 180° todos na mesma direcção, em torno de y). Um spin eco é depois produzido. O processo pode ser repetido por aplicação sucessiva de impulsos 180°_x produzindo uma série de ecos. As amplitudes dos ecos decaem exponencialmente à medida que a relaxação spin-spin ocorre (Figura 1.26).

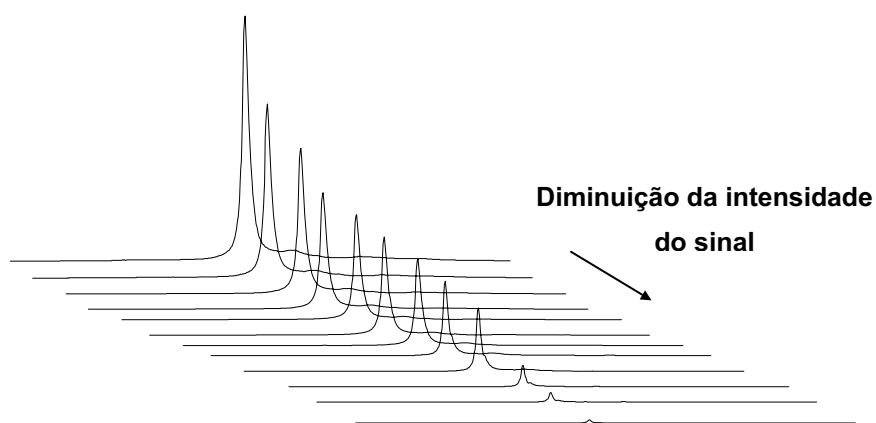


Figura 1.26 - Conjunto de espectros obtidos ao longo de uma experiência de medição do tempo de relaxação transversal, através do método de Carr-Purcell-Meibom-Gill (CPMG)

O valor T_{2H} é obtido fazendo um ajuste exponencial das intensidades $I(\tau)$ dos picos do espectro registadas experimentalmente, versus o tempo (t):

$$I(\tau) \propto \exp(-t/T_2) \quad \text{eq. 1.37}$$

onde $t = n\tau$.

A não-homogeneidade da rede alarga o espectro de ressonância e a medição do T_{2H} depende da capacidade de se eliminar os efeitos do alargamento de banda. Se o componente y do vector de magnetização decair a uma constante de tempo T_{2*} , então a linha de espectro é alargada e a sua largura a meia altura pode ser relacionada com o valor de T_{2*} :

$$\Delta\nu_{1/2} = 1/\pi T_{2*} \quad \text{eq. 1.36}$$

I. 2.2.4. Técnicas de RMN de sólidos para a observação de spins pouco abundantes

Em RMN de sólidos, a obtenção de espectros de alta resolução de núcleos pouco abundantes tais como o ^{13}C , apresenta três problemas principais: o alargamento devido às interacções dipolares heteronucleares (tipicamente, entre ^{13}C e ^1H); o alargamento devido à anisotropia do desvio químico; e a baixa sensibilidade devida aos tempos de relaxação spin-rede dos núcleos ^{13}C serem muito longos. Estas dificuldades podem ser ultrapassadas através da combinação de três técnicas: o *desacoplamento de alta potência*, a *rotação segundo o ângulo mágico* (MAS) e a *polarização cruzada* (CP). A técnica de desacoplamento de alta potência ataca o problema do alargamento de banda, a técnica de MAS reduz o efeito do alargamento devido às interacções dipolares entre ^1H e ^{13}C e sobretudo devido à anisotropia de desvio químico, e a técnica de CP melhora em cerca de quatro vezes a razão sinal/ruído para o ^{13}C e permite tempos de aquisição mais curtos (Harris, 1987; Gil e Geraldes, 1987). Estas três técnicas quando usadas em conjunto permitem a obtenção de linhas mais estreitas nos espectros de amostras sólidas (Figura 1.27), por possibilitarem a medianização das interacções acima descritas (§ I.2.2.1) numa escala de tempo que é curta comparativamente com as larguras de banda dos espectros.

I. 2.2.4.1. Desacoplamento de alta potência

Devido à baixa abundância natural de ^{13}C ($\sim 1\%$), os espectros de RMN de sólidos são alargados principalmente devido às interações dipolares heteronucleares entre os núcleos ^{13}C e núcleos abundantes tais como os prótons directamente ligados ou próximos, as quais são tipicamente da ordem das dezenas de kHz (Fyfe, 1983; Harris, 1987; Gil e Gerald, 1987). Os efeitos destas interações podem ser eliminados pela técnica de ressonância dupla de desacoplamento dos prótons, na qual uma fonte de radiofrequência é utilizada para a observação do sinal de um dado núcleo (p.ex. ^{13}C) e outra fonte irradia fortemente a ressonância do núcleo a ser desacoplado (p.ex. ^1H). O efeito médio dipolar do próton exercido sobre o núcleo ^{13}C é então diminuído.

I. 2.2.4.2. Rotação segundo o ângulo mágico (MAS)

Em RMN de sólidos, quer a interação dipolar quer as interações de desvio químico apresentam uma dependência geométrica do tipo $(3 \cos^2 \theta - 1)$ (θ é o ângulo entre o vector internuclear e o campo magnético \mathbf{B}_0). Em soluções não-viscosas, o movimento molecular rápido e isotrópico anula em média o factor geométrico, originando sinais RMN muito estreitos.

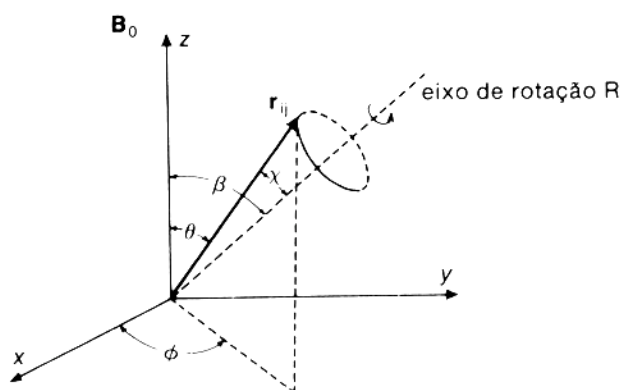


Figura 1.27 – Rotação macroscópica da amostra segundo um ângulo β (ângulo mágico) em relação ao campo magnético aplicado \mathbf{B}_0 .

A técnica de MAS consiste na rotação da amostra sólida em torno de um eixo segundo um ângulo, β , de 54.74° , o chamado ângulo mágico (Figura 1.27). Uma vez que a função $(3 \cos^2 \theta - 1)$ se anula para $\theta = 54.74^\circ$, o alinhamento de todos os vectores segundo este ângulo anula a interacção dipolar e as interacções de desvio químico, dando apenas um único valor de desvio químico, correspondente ao valor isotrópico observado em RMN de líquidos.

I. 2.2.4.3. Polarização cruzada

Os núcleos pouco abundantes, como o ^{13}C , possuem tempos de relaxação T_1 muito longos, constituindo um grave problema de sensibilidade em RMN de sólidos. Esta dificuldade tem sido resolvida pela técnica de polarização cruzada, introduzida por Hartmann e Hann em 1962, a qual consiste na derivação da magnetização ^{13}C a partir dos spins ^1H . A transferência de magnetização ocorre no referencial rotativo pela operação de trancagem de spin, através da sequência de pulso indicada na Figura 1.28.

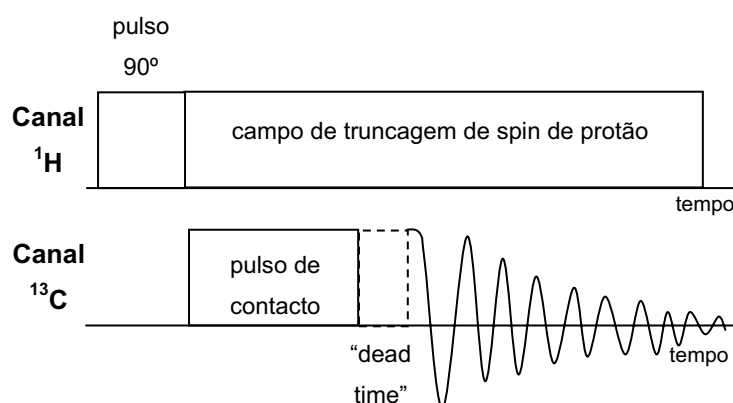


Figura 1.28 - Diagrama da sequência de pulsos utilizada na polarização cruzada de um reservatório de spin de protão para spins de carbono em sólidos.

O primeiro passo consiste na aplicação de um pulso de 90° no canal do protão, trancando o spin do protão na direcção y do referencial rotativo. A fonte de rádio-frequência do canal ^{13}C é depois ligada e a amplitude do campo magnético B_{1C} é ajustada de modo a que a condição de ressonância dupla de Hartmann-Hann seja satisfeita:

$$\gamma_H \mathbf{B}_{1H} = \gamma_C \mathbf{B}_{1C} \quad \text{eq. 1.37}$$

Esta condição implica que as magnetizações dos prótons e dos carbonos precessem à mesma frequência nos respectivos referenciais rotativos e que as energias respectivas sejam comparáveis, e os seus desdobramentos de Zeeman nestes referenciais serão iguais, permitindo uma transferência rápida (dezenas de μs) de magnetização entre os dois sistemas. O processo de polarização cruzada resolve o problema dos tempos de relaxação T_1 (C) longos no sentido em que o tempo de espera entre o fim do sinal de aquisição e o próximo pulso de 90° é determinado pelo T_1 (H) em vez do mais longo T_1 (C).

CAPÍTULO II

FRACCIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FARINHAS DE TRIGO DAS CULTIVARES AMAZONAS E SORRAIA



II. 1. Introdução

Tendo em vista a caracterização estrutural e reológica das farinhas de trigo das variedades *Amazonas* e *Sorraia* e de alguns dos seus componentes mais representativos, procedeu-se à obtenção das diferentes fracções constituintes das farinhas de trigo, recorrendo-se a métodos de fraccionamento e purificação com base na diferente solubilidade dos componentes, e à caracterização físico-química das farinhas em estudo e dos constituintes assim obtidos.

As farinhas de trigo (*Triticum aestivum* spp. *Vulgare*) foram gentilmente cedidas pela Estação Nacional de Melhoramento de Plantas (ENMP - Elvas, Portugal) e foram seleccionadas de acordo com o seu grau de dureza, representando farinhas com comportamentos tecnológicos diferentes. A farinha da variedade “*Amazonas*” (AMA) corresponde a uma farinha do tipo mole e a farinha da variedade “*Sorraia*” (SOR) corresponde a uma farinha do tipo duro. Estas duas variedades, caracterizadas na ENMP, possuem diferentes características: A variedade SOR apresentou maior dureza de grão (NIR, método AACC 39-70A (1997)) e é uma farinha que produz uma massa com maior força de glúten, maior tenacidade e menor extensibilidade (com base no alveograma), do que a variedade AMA.

Neste capítulo faz-se primeiramente uma abordagem aos métodos de fraccionamento e purificação adoptados e, posteriormente, refere-se a caracterização físico-química das farinhas de trigo bem como das principais fracções (glúten, amido e pentosanas hidrossolúveis) utilizadas ao longo deste trabalho.

II. 2. Materiais e Métodos

II. 2.1. Fraccionamento das Farinhas

Antes de se proceder ao fraccionamento nos seus constituintes principais, as farinhas de trigo *Amazonas* e *Sorraia* foram previamente deslipidificadas com clorofórmio, segundo o método descrito por MacRitchie (1985). Este método baseou-se numa extracção repetida

de lípidos da farinha usando o clorofórmio como solvente, extraíndo-se os lípidos apolares e parte dos lípidos polares, quer associados quer não associados aos componentes das farinhas. Apesar das fracções usadas no presente estudo serem derivadas do fraccionamento de farinhas deslipidificadas, foi também realizado o fraccionamento das farinhas originais, com lípidos, para posterior comparação.

O fraccionamento das farinhas nas suas subfracções baseou-se num método descrito por Czuchajowska e Pomeranz (1993) com algumas alterações, nomeadamente a modificação da proporção água: farinha, alteração do tempo de contacto água/farinha e adição de azida sódica. O método de fraccionamento consistiu no desenvolvimento da massa, com uma proporção água: farinha de 3:1, seguido pela sua desintegração e centrifugação do sistema obtido. Para o desenvolvimento da massa recorreu-se ao amassamento manual num almofariz, seguindo-se a desintegração num copo misturador (Comercial Blender - Warig-Blender 800) com uma rotação de 50-60 Hz. A mistura obtida foi então centrifugada a 2200 rpm a 20°C. O procedimento adoptado encontra-se esquematizado na Figura 2.1.

Após a centrifugação da dispersão de farinha obtiveram-se 6 camadas distintas (Figura 2.2.), separadas com base na sua diferente densidade. Cada uma das camadas foi separada manualmente e subsequentemente purificada.

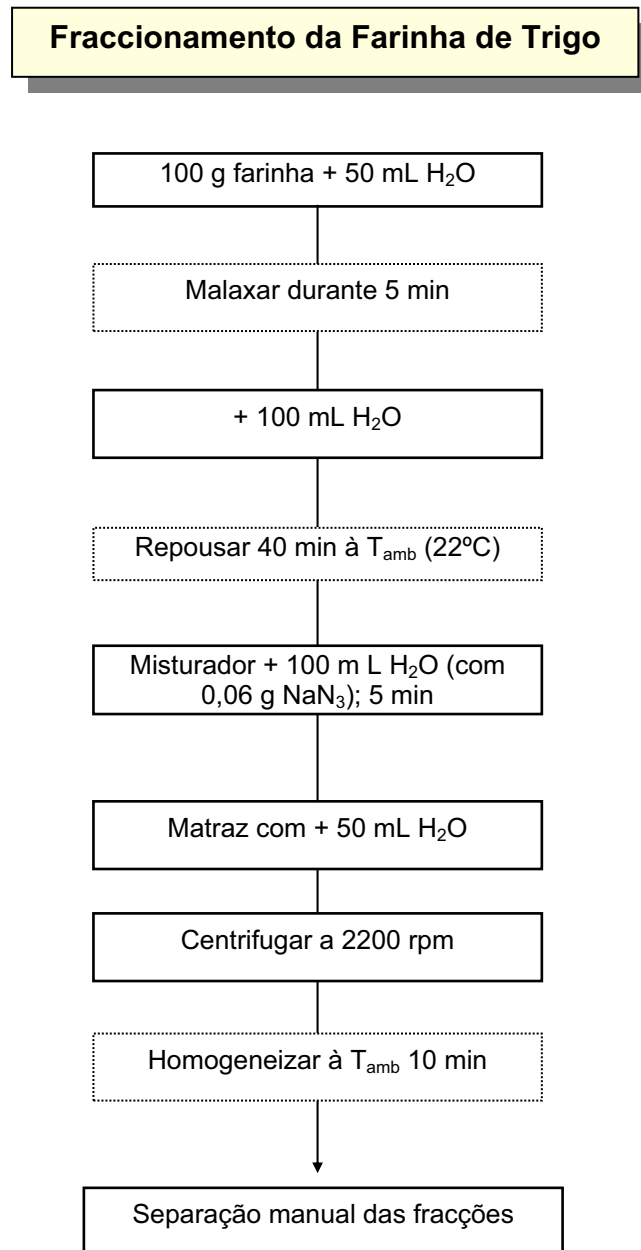


Figura 2.1 - Esquema do procedimento adoptado para o fraccionamento das farinhas nos seus constituintes principais

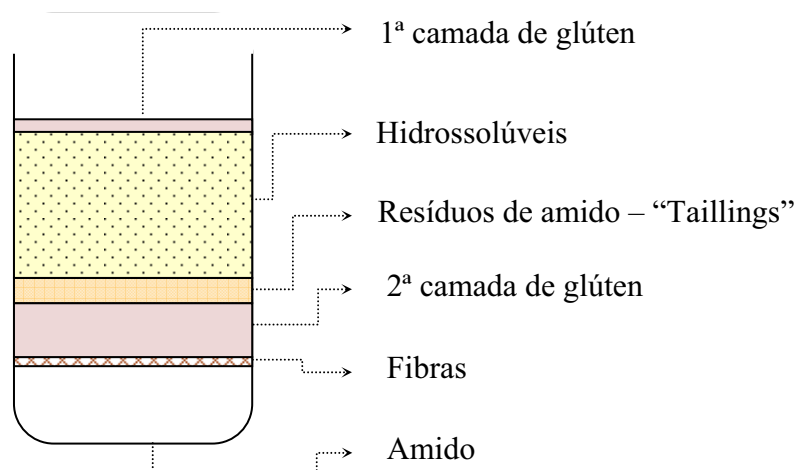


Figura 2.2. - Camadas e fracções obtidas após centrifugação da dispersão da farinha

II. 2.1.1. Purificação do Glúten

As duas camadas de glúten obtidas no fraccionamento foram misturadas numa só fracção e posteriormente tratadas. O amido residual existente no glúten foi retirado por lavagem do glúten com solução diluída de NaCl (20% m/m) com a ajuda de um equipamento Glutomatic (Perten Laboratories, CRC), e posterior lavagem abundante com água desionizada de modo a eliminar os resíduos de NaCl. O glúten purificado foi liofilizado e triturado num moinho com um anel de malha 0,5 mm.

II. 2.1.2. Purificação do Amido

Após a separação manual da fracção de amido, esta foi re-dispersa em água destilada, separada por filtração e lavada com solventes orgânicos de volatilidade crescente (etanol, acetona e éter etílico). A amostra assim purificada foi seca numa estufa a 35°C.

II. 2.1.3. Sub-fracionamento do amido em fracções de tamanhos de grânulos diferentes

O amido foi ainda fraccionado em fracções de diferentes tamanhos de grânulos, com base num método de sedimentação descrito por Meredith (1981). Para cada amostra de amido preparou-se uma dispersão a 20% (m/m) em etanol e agitou-se durante 15 min. A suspensão foi filtrada de modo a remover traços de fibras e grumos de amido. A suspensão foi fraccionada por sedimentações sucessivas usando copos de 1000 mL e 300 mL de etanol para resuspender os sedimentos. As fracções foram recolhidas ao fim de 2, 4, 8, 30 e 120 min. O fraccionamento terminou quando os sobrenadantes se apresentaram substancialmente claros. Os sedimentos foram separados por filtração, lavados com acetona e éter, e secos sob vácuo à temperatura ambiente. A Figura 2.3. apresenta o esquema do método de fraccionamento do amido.

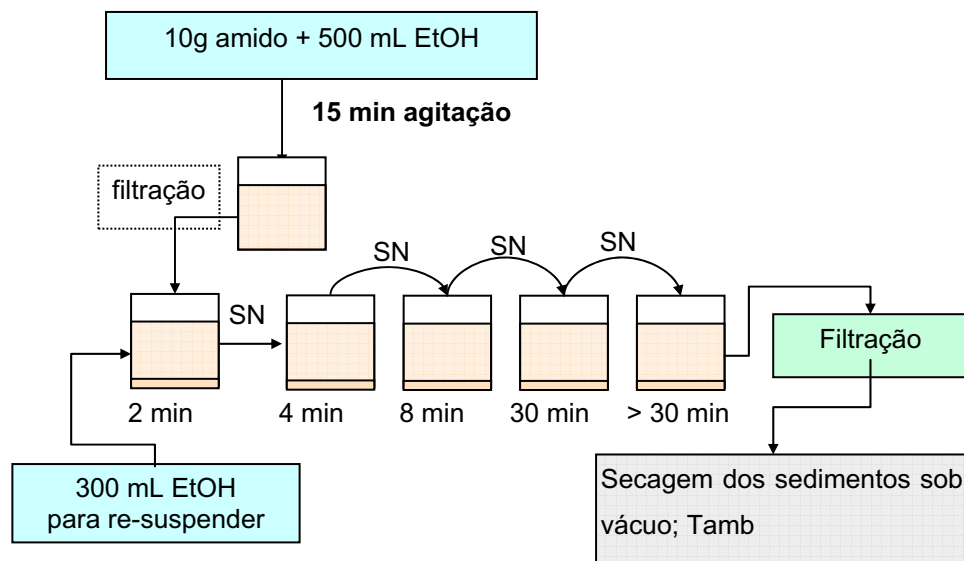


Figura 2.3 - Esquema do método adoptado de fraccionamento do amido em fracções de diferentes tamanhos de grânulos.

II. 2.1.4. Extração das Pentosanas Hidrossolúveis

As pentosanas hidrossolúveis foram extraídas da fracção dos hidrossolúveis de acordo com os métodos descritos por Izydorczyk *et al.* (1990) e Vinkx *et al.* (1993), com algumas

modificações. O método adoptado envolveu a desnaturação térmica das proteínas hidrossolúveis presentes, adsorção de compostos por contacto com sílica de diatomáceas (Celite®, Sigma-Aldrich Quimica SA, Sintra, Portugal), hidrólise enzimática de cadeias de amido solúveis com α -amilase termoestável (Tipo XII-A de *Bacillus licheniformis*, Sigma-Aldrich Quimica SA), precipitação e purificação das pentosanas em solventes orgânicos. Esta fracção de pentosanas é referenciada ao longo do trabalho como pentosanas hidrossolúveis originais (PHS-or). Numa segunda fase, as pentosanas hidrossolúveis originais foram purificadas com o objectivo de reduzir a quantidade de proteína ainda presente na fracção original. Esta purificação baseou-se no método descrito por Courtin e Delcour (1998) que consistiu na re-dissolução das pentosanas hidrossolúveis originais em água, remoção das proteínas residuais por acção de um adsorvente mais eficaz (Montmorillonite - Aluminum Pillared Clay - Fluka Chemika, Switzerland), e re-precipitação das pentosanas em solventes orgânicos. A Figura 2.4. apresenta o esquema dos métodos seguidos para a extracção e purificação das pentosanas hidrossolúveis.

II. 2.2. Caracterização Físico-Química

II. 2.2.1. Farinhas

As farinhas foram caracterizadas quanto ao seu teor em proteínas, humidade, cinzas, amido total, amido danificado, pentosanas (solúveis e totais) e lípidos livres.

Os teores em humidade e cinzas foram determinados de acordo com os métodos normalizados da *American Association of Cereal Chemists* (AACC, 1995), métodos AACC 44-16 e 08-17, respectivamente.

O doseamento das proteínas totais efectuou-se pelo método de Kjeldhal, de acordo com o método AACC 46-11A.

As determinações do teor de amido total e amido danificado foram efectuadas recorrendo-se a métodos enzimáticos descritos por McCleary *et al.* (1994) e Gibson *et al.* (1991), respectivamente, usando kits de doseamento da Megazyme (Megazyme Total Starch kit e Megazyme Damaged Starch kit, Megazyme, Wicklow, Ireland).

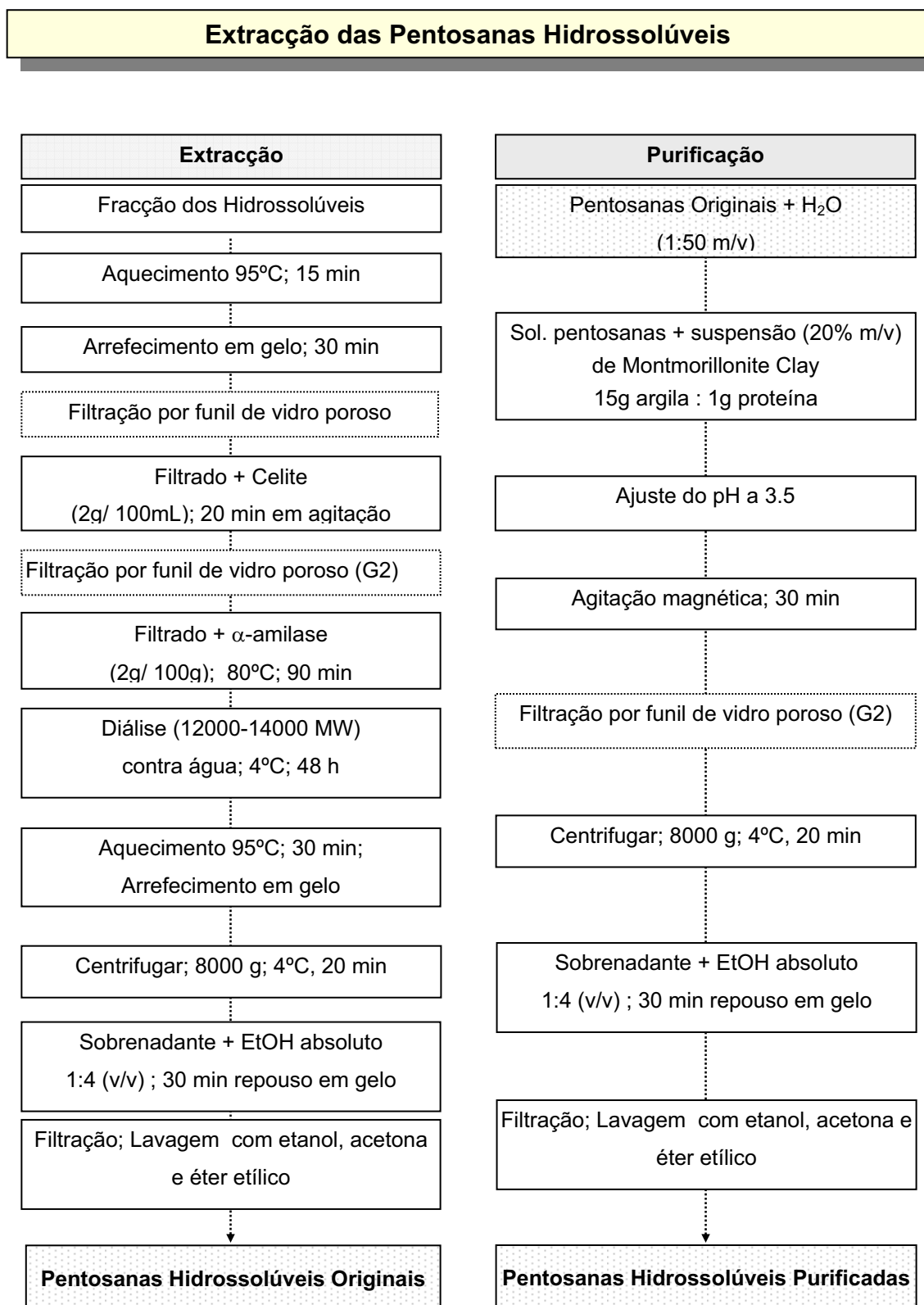


Figura 2.4 - Esquema dos métodos adoptado para a extracção e purificação das pentosanas hidrossolúveis

Para o doseamento das pentosanas solúveis e das pentosanas totais existentes nas farinhas utilizou-se o método ácido clorídrico-orcinol (Hashimoto *et al.*, 1987). O doseamento de lípidos livres das farinhas foi efectuado de acordo com o método AACC 30-25.

II. 2.2.2. Glúten

As amostras de glúten foram caracterizadas em termos do teor de proteínas, humidade, cinzas, amido total, e lípidos totais pelos métodos discriminados para a caracterização das farinhas.

II. 2.2.3. Amido

As amostras de amido foram igualmente caracterizadas em termos do teor de proteínas, humidade, cinzas, amido total, amido danificado e lípidos totais pelos métodos discriminados para a caracterização das farinhas. Para as amostras de amido foi ainda determinada a razão do teor de amilose/amilopectina de acordo com o método descrito por Gibson *et al.* (1997), usando também um kit enzimático da Megazyme (Megazyme Amilose/Amilopectin kit, Megazyme, Wicklow, Ireland).

A distribuição dos tamanhos dos grânulos das amostras de amido e das fracções de amido com diferentes tempos de sedimentação, foi avaliada em dispersões aquosas de amido a 20% (m/m), utilizando-se um *Analizador de Tamanho de Partículas por Difracção Laser* (Computer controlled laser diffraction particle size analyser - Coulter® LS, Coulter Electronics, Beds, England).

Os lípidos polares internos foram extraídos e quantificados de acordo com o método descrito por Eliasson *et al.* (1981). Estes lípidos foram extraídos por extracção sucessiva com isopropanol e uma solução saturada água: butanol (20:80 v/v).

As amostras de amido originais bem como as fracções de diferentes tamanhos de grânulos foram ainda visualizadas ao microscópio óptico e ao microscópio electrónico de varrimento (SEM).

II. 2.2.4. Pentosanas Hidrossolúveis

As amostras de pentosanas originais e purificadas foram caracterizadas em termos do conteúdo de proteína, composição em açúcares neutros e viscosidade intrínseca. O teor de proteína foi determinado através do método descrito por Lowry *et al.* (1951), utilizando um kit de microdeterminação (Sigma kit procedure No. 690, Sigma-Aldrich Quimica SA, Sintra, Portugal). A composição em açúcares neutros foi determinada por cromatografia gasosa após hidrólise ácida com ácido sulfúrico (Selvendran *et al.*, 1979) e derivatização a acetatos de alditol (Blakeney *et al.*, 1983). Utilizou-se um cromatógrafo Carlo Erba 6000, um detector de ionização por chama (FID) e uma coluna DB-225 (30 m x 0.25 mm, espessura do filme interno 0.25 μ m, J&W). O forno foi operado com programação de temperatura: 5 min a 220 °C, aumento até 230 °C a 20 °C/min e mantido 6 min a esta temperatura. A taxa de fluxo do gás de arraste (H_2) foi de 1 mL/min a 220 °C. A temperatura do injetor foi 220 °C e do detector 230 °C. A viscosidade intrínseca foi determinada por viscosimetria capilar com um viscosímetro Cannon-Fenske (Figura 2.5), a $25^\circ\text{C} \pm 0.1$, de acordo com o método descrito por Lopes da Silva *et al.* (1992).

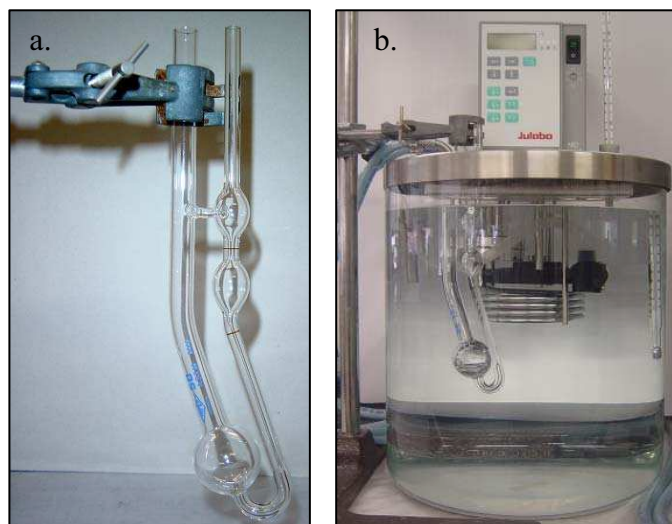


Figura 2.5 - Viscosímetro capilar Cannon-Fenske (a) e banho termostatizado (b) utilizados para a determinação da viscosidade intrínseca das pentosanas hidrossolúveis.

A viscosidade relativa (η_{rel}) e a viscosidade específica (η_{sp}) foram calculadas respectivamente pelas equações 2.1 e 2.2, usando a água como solvente:

$$\eta_{rel} = \frac{\text{tempo de fluxo da solução do polímero}}{\text{tempo de fluxo do solvente}} \quad \text{eq. 2.1}$$

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 \quad \text{eq. 2.2}$$

onde:

η_{rel} - viscosidade relativa (= viscosidade da solução de polímero / viscosidade do solvente)

η_{sp} - viscosidade específica (=viscosidade relativa -1)

A viscosidade intrínseca ($[\eta]$) foi calculada a partir das equações de Huggins (§ I.2.1.3.2, eq. 1.21) e de Kraemer (§ I.2.1.3.2, eq. 1.22).

II. 3. Resultados e Discussão

II. 3.1. Caracterização das farinhas

As farinhas em estudo apresentaram diferenças ligeiras na sua composição (Tabela 2.1.), embora estas diferenças possam ter algum significado para as propriedades funcionais exibidas por estas farinhas. Salientam-se os teores mais elevados de amido e amido danificado apresentados pela variedade SOR. O teor de pentosanas hidrossolúveis (PHS) foi ligeiramente superior na farinha AMA. As PHS desempenham um papel importante na afinidade da farinha para a água e na competição entre os diversos componentes da farinha para a água (Jelaca e Hlynka, 1971; Meuser e Suckow, 1988; Michniewicz *et al.*, 1991; Rouau *et al.*, 1994), o que poderá influenciar as propriedades funcionais das farinhas.

A farinha SOR apresentou uma maior percentagem de amido danificado, tal como seria já de esperar. Devido ao seu carácter, após o processo de moagem, as farinhas de trigos duros apresentam uma maior quantidade de grânulos de amido danificados. Por esta razão, é bastante comum usar o teor de amido danificado como um indicador do grau de dureza de uma farinha (Eliasson e Larsson, 1993). A presença de amido mecanicamente danificado é um factor determinante para as propriedades de uma farinha, aumentando a sua capacidade de absorção de água e afectando o processo de gelatinização do amido (Farrand, 1964; Pomeranz e Williams, 1990; Eliasson e Larsson, 1993; Edwards *et al.*, 1999; Hoseneey,

1998; Bushuk, 1998; Rahman *et al*, 2000). O amido danificado absorve cerca de 100% da sua massa em água, enquanto que os grãos de amido não danificados absorvem apenas 30%. O amido danificado fica também mais susceptível à degradação enzimática pelas α -amilases, o que, quando em excesso, pode ser um factor prejudicial para o processo de panificação (Bushuk, 1998).

Tabela 2.1 - Composição química das farinhas *Amazonas* e *Sorraia* (% relativa à matéria seca, excepto humidade) ¹

	Amazonas	Sorraia
% Humidade	12,53 \pm 0,01	13,84 \pm 0,01
% Cinzas	0,564 \pm 0,004	0,637 \pm 0,002
% Lípidos livres	1,30 \pm 0,01	1,55 \pm 0,09
% Proteínas	12,0 \pm 0,5	12,6 \pm 0,2
% Amido	79,8 \pm 0,3	83,0 \pm 0,5
% Amido danificado	3,25 \pm 0,19	6,56 \pm 0,05
% Pentosanas hidrossolúveis	1,18 \pm 0,01	1,08 \pm 0,01

¹Os valores apresentados correspondem à média de três ensaios \pm desvio padrão

II. 3.2. Fracionamento das farinhas

Tal como já acima referido (§ 2.1), e em concordância com o obtido por Czuchajowska e Pomeranz (1993), no fracionamento da farinha obtiveram-se seis camadas bem definidas: uma 1^a camada superior de glúten, uma camada de componentes hidrossolúveis, uma camada de resíduos de amido ou “taillings”, uma 2^a camada de glúten, uma camada de fibras insolúveis e, por fim, na camada inferior, uma camada de amido (ver Figura 2.2). Com a excepção da camada das fibras, todas as camadas foram facilmente separadas por arrastamento, podendo a sua quantidade ser estimada. As camadas de fibras eram bastante finas, especialmente no caso das farinhas deslipidificadas, pelo que a sua quantificação se tornou difícil.

A Figura 2.6 apresenta os resultados do fraccionamento das farinhas originais e deslipidificadas em termos da proporção das principais fracções obtidas. Nas barras do gráfico estão indicadas as percentagens respectivas a cada fracção. A quantidade de glúten total refere-se à soma das duas camadas de glúten. Por cada 100 g de farinha foram obtidos cerca de 175 mL da fracção de hidrossolúveis. Esta fracção inclui parte da água adicionada na qual se dissolveram os constituintes hidrossolúveis tais como proteínas e hidratos de carbono hidrossolúveis, dos quais fazem parte as pentosanas hidrossolúveis.

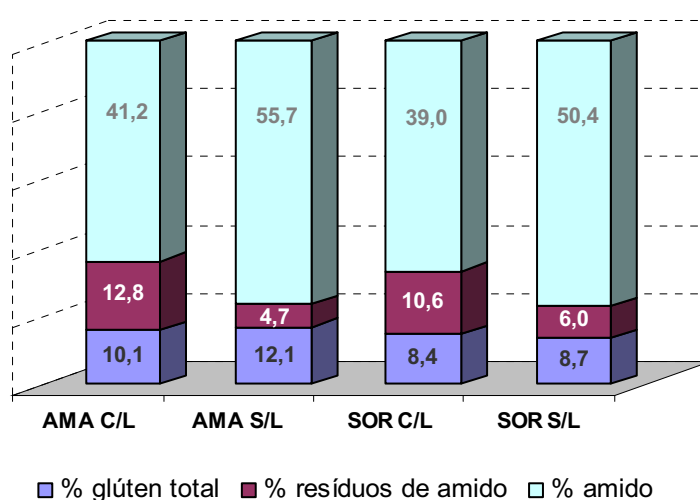


Figura 2.6 - Proporção das fracções glúten, resíduos de amido e amido obtidas no fraccionamento das farinhas *Amazonas* e *Sorraia*, originais (C/L) e deslipidificadas (S/L). Os valores no interior das barras indicam a percentagem (m/m) respectiva a cada fracção.

Verifica-se que a partir da farinha AMA obteve-se uma maior quantidade de glúten do que a partir da farinha SOR, independentemente do processo de deslipidificação. Os resultados parecem sugerir uma dependência da distribuição da camada de amido e da camada dos resíduos de amido face à deslipidificação: a não extracção dos lípidos originou uma maior quantidade de resíduos de amido e uma menor quantidade da camada de amido. Com a extracção de lípidos, parte dos resíduos de amido deverá possivelmente ter passado para a camada inferior de amido, o que se deverá provavelmente à quebra dos complexos amido-lípidos aquando do processo de deslipidificação, e consequente libertação de amido. Relativamente à camada de glúten, a extracção de lípidos parece ter afectado sobretudo a

variedade AMA, tendo a quantidade de glúten aumentado após a deslipidificação. No caso da variedade SOR, a quantidade de glúten obtida foi semelhante para a farinha original e deslipidificada.

II. 3.3. Caracterização das Fracções Isoladas

II. 3.3.1. Glúten

Relativamente aos parâmetros determinados, não foram encontradas diferenças significativas quanto à composição química das amostras de glúten das duas variedades, tal como é apresentado na Tabela 2.2. Porém, a percentagem de proteína foi ligeiramente superior no caso do glúten da variedade AMA, com uma percentagem de cerca de $89,1 \pm 0,6\%$ e $86,7 \pm 0,1\%$ para os glúten da variedade AMA e SOR, respectivamente.

Tabela 2.2 - Composição das amostras de glúten obtidas a partir das farinhas Amazonas (AMA) e Sorraia (SOR). Resultados relativos à massa seca de amostra, excepto para a humidade¹.

	Amazonas	Sorraia
% Humidade	$3,4 \pm 0,2\%$	$3,6 \pm 0,2\%$
% Proteína	$89,1 \pm 0,6\%$	$86,7 \pm 0,1\%$
% Amido total	$6,3 \pm 0,2\%$	$6,9 \pm 0,3\%$
% Cinzas	$0,38 \pm 0,04\%$	$0,41 \pm 0,07\%$

¹Os valores apresentados correspondem à média de três ensaios \pm desvio padrão

II. 3.3.2. Amido

A composição química das amostras de amido está apresentada na Tabela 2.3. De um modo geral, relativamente aos parâmetros determinados, não se encontraram diferenças significativas quanto à composição química das amostras de amido das duas variedades. No entanto, à semelhança do observado para as duas farinhas, também aqui se verificou que o amido da variedade SOR apresentou uma maior percentagem de amido danificado (1,12%) comparativamente ao amido da variedade AMA (0,67%), o que seria previsível dada a maior dureza do grão da variedade de trigo SOR. Comparando a quantidade de

amido danificado presente nas farinhas com a quantidade de amido danificado presente nas fracções de amido, verifica-se que uma grande parte do amido danificado foi separada durante o fraccionamento das farinhas. Uma análise efectuada à fracção dos resíduos de amido, obtida durante o fraccionamento das farinhas, revelou percentagens de amido danificado de $5,70 \pm 0,36 \%$ e $5,63 \pm 0,09 \%$ para as fracções das variedades AMA e SOR, respectivamente. Estes resultados sugerem que grande parte do amido danificado presente nas farinhas terá ficado retida na fracção dos resíduos de amido, tal como já anteriormente reportado por outros autores (Hoseney, 1984; Krishnarau e Hoseney, 1994).

A quantidade de lípidos livres determinada foi ligeiramente superior no amido da variedade SOR (1,55%) comparativamente ao amido da variedade AMA (1,30%). Os lípidos livres presentes no amido encontram-se adsorvidos à superfície dos grânulos de amido. Uma maior percentagem de lípidos livres indica que uma maior quantidade de lípidos se encontra associada aos grânulos de amido, formando como que uma camada que serve de barreira à difusão de outros compostos no interior dos grânulos, nomeadamente a água (Eliasson *et al.*, 1981).

Tabela 2.3 - Composição dos amidos obtidos a partir das farinhas Amazonas (AMA) e Sorraia (SOR). Resultados relativos a massa seca de amostra, excepto para a humidade¹.

	Amazonas	Sorraia
% Humidade	$11,9 \pm 0,4\%$	$12,0 \pm 0,1\%$
% Amido total	$93,0 \pm 0,3\%$	$92,2 \pm 0,4\%$
% Proteína residual	$0,38 \pm 0,04\%$	$0,41 \pm 0,07\%$
% Cinzas	$0,45 \pm 0,07\%$	$0,46 \pm 0,05\%$
% Lípidos livres	$1,30 \pm 0,02\%$	$1,55 \pm 0,06\%$
% Lípidos internos	$0,22 \pm 0,03\%$	$0,29 \pm 0,05\%$
% Amido danificado	$0,67 \pm 0,01\%$	$1,12 \pm 0,05\%$
% Amilose	$22,3 \pm 1,4$	$26,2 \pm 0,4$
Tamanho médio dos grânulos	$15,6 \pm 0,5 \mu\text{m}$	$17,0 \pm 0,2 \mu\text{m}$

¹Os valores apresentados correspondem à média de três ensaios \pm desvio padrão

O amido da variedade AMA apresentou menores percentagens de amilose e de lípidos internos, comparativamente ao amido da variedade SOR. A existência de uma correlação

entre o conteúdo de lípidos e de amilose nos amidos foi anteriormente reportada por outros autores (South *et al.*, 1991). A percentagem de lípidos internos aqui determinada corresponde à fracção extraída com solução saturada água: butanol e representa os lípidos que se encontram no complexo amilose-lípidos (Eliasson *et al.*, 1981).

Pela análise da distribuição do tamanho dos grânulos, verificou-se que ambas as amostras de amido apresentaram uma distribuição bimodal, característica do amido de trigo (Eliasson e Karlsson, 1983; Bechtel *et al.*, 1993; Stoddard, 1999), tendo apresentado basicamente uma população com tamanhos de grânulos mais pequenos, os grânulos do tipo B, e outra população com tamanhos de grânulos maiores, os grânulos do tipo A.

A Figura 2.7 apresenta as curvas de distribuição das populações de diferentes tamanhos dos grânulos de amido, obtidas para as variedades AMA e SOR, com base no diferente comportamento de sedimentação dos grânulos dispersos em etanol.

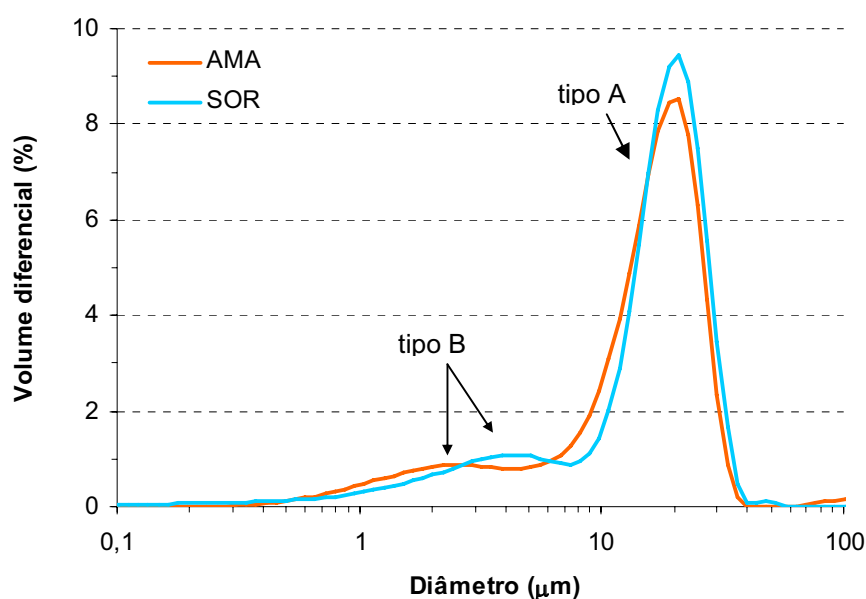


Figura 2.7 - Distribuição de tamanhos dos grânulos dos amidos extraídos das farinhas variedades Amazonas (AMA) e Sorraia (SOR)

Os grânulos com diferentes tamanhos podem ser visualizados na Figura 2.8 que apresenta uma fotografia tirada ao microscópio de varrimento electrónico. Nesta figura são visualizados os grânulos de amido no estado seco. Após a hidratação, os grânulos absorvem água e aumentam um pouco mais de tamanho. Para o fracionamento do amido

em subfracções de diferentes tamanhos, o amido foi disperso em etanol de modo a minimizar o aumento do tamanho dos grânulos por efeito da hidratação. As fracções foram separadas segundo diferentes tempos de sedimentação. A Tabela 2.4 apresenta os resultados da distribuição de tamanhos das fracções de amido obtidas após os diferentes tempo de sedimentação.

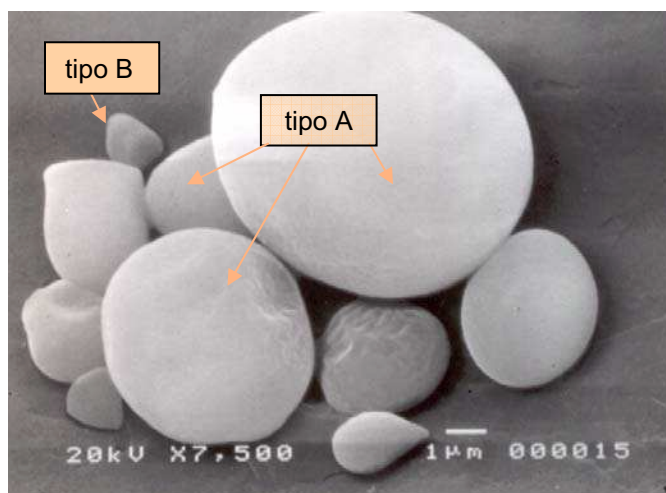


Figura 2.8 - Grânulos de amido da variedade Amazonas vistos ao microscópio de varrimento electrónico (SEM)

Os grânulos de maior tamanho sedimentaram primeiro e correspondem à fracção de 2 min. A maior diferença de tamanhos de grânulos foi detectada apenas para o tempo de sedimentação superior a 30 minutos (> 30 min), pelo que se considerou que os grânulos com tempo de sedimentação até 30 minutos formam a população de grânulos do tipo A, com tamanhos na gama de 15-20 μm , e os grânulos com tempos de sedimentação superiores a 30 minutos formam a população de grânulos do tipo B, com tamanhos na gama de 6-8 μm . A Figura 2.9 apresenta a distribuição dos tamanhos de grânulos para as fracções com tempos de sedimentação entre 8 e 30 minutos (30 min) e superiores a 30 minutos (> 30 min). A fracção com tempo de sedimentação até 30 minutos apresentou ainda alguns grânulos de menor tamanho, os quais poderão ter sido arrastados pelos grânulos maiores

Tabela 2.4 - Resultados da distribuição do tamanho de grânulos das frações de amido, obtidas em diferentes tempos de sedimentação em dispersões em etanol. Média de valores obtidos em triplicado para dispersões de amido (20% m/v) , após 30 min de suspensão.

Amido	Proporção relativa	Média do tamanho dos grânulos (μm)	Largura da distribuição [#]
Amazonas			
2 min	1%	$15,4 \pm 2,5$	0,53
4 min	3%	$17,7 \pm 2,2$	0,50
8 min	19%	$18,7 \pm 0,6$	0,45
30 min	69%	$15,9 \pm 0,2$	0,47
>30 min	8%	$7,4 \pm 0,3$	0,61
Sorraia			
2 min	3,5%	$20,4 \pm 0,2$	0,54
4 min	6%	$20,4 \pm 0,01$	0,46
8 min	39%	$19,2 \pm 1,7$	0,48
30 min	48%	$16,0 \pm 2,0$	0,48
>30 min	3,5%	$6,9 \pm 0,8$	0,69

[#]Largura definida como a razão entre o desvio padrão da distribuição e a média

Por observação da Figura 2.9 e da Tabela 2.4 verifica-se que o amido da variedade AMA apresentou diâmetros mais pequenos para os grânulos tipo A ($15,4\text{-}18,7 \mu\text{m}$) comparativamente à variedade SOR ($16,0\text{-}20,0 \mu\text{m}$), tendo esta última apresentado uma maior proporção relativa de grânulos com menor tempo de sedimentação (<30 min). A média de tamanhos dos grânulos tipo B foi semelhante entre os amidos de ambas as variedades ($6,9\text{-}7,4 \mu\text{m}$). Porém, o amido da variedade AMA apresentou uma maior proporção relativa de grânulos do tipo B, i.e. com tempo de sedimentação >30 min. A distribuição de tamanhos de grânulos determinada para os amidos das variedades AMA encontram-se dentro das gamas de tamanhos reportadas por outros autores. Os tamanhos dos grânulos podem variar entre variedades de trigo, bem como entre métodos de determinação do tamanho dos grânulos. A Tabela 2.5 apresenta um resumo de tamanhos de grânulos de amido encontrados em bibliografia.

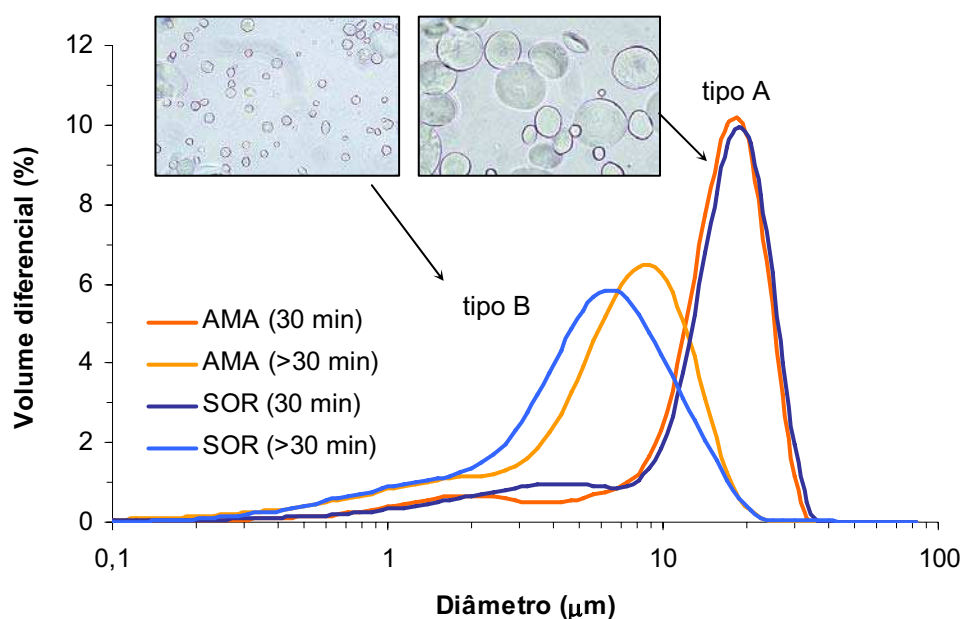


Figura 2.9 - Distribuição de tamanhos dos grânulos para frações de amido com tempos de sedimentação entre 8 e 30 minutos e superior a 30 minutos, resultantes do fracionamento dos amidos das farinhas Sorraia (SOR) e Amazonas (AMA). Incluem-se fotografias tiradas ao microscópio óptico (ampliação total: 500x) para as respectivas populações de grânulos.

Tabela 2.5 - Tamanhos de grânulos de amido encontrados em bibliografia

Grânulos tipo A (μm)	Grânulos tipo B (μm)	Fonte
15 - 30	3 - 7	Flint, 1994
22 - 36	2 - 3	Jane <i>et al.</i> , 1994
20.2	3.2	Meredith <i>et al.</i> , 1978
17	4	Morrison e Scott, 1986
35	4	Swinkels, 1985
>15.9	<5.3	Bechtel <i>et al.</i> , 1990
15 - 30	< 10	Galliard e Bowler, 1986

II. 3.3.3. Pentosanas Hidrossolúveis

As pentosanas hidrossolúveis representam uma fracção muito pequena das farinhas AMA e SOR. A partir da fracção dos hidrossolúveis obtiveram-se cerca de 0,5 g de PHS originais por cada 100 g de farinha, para ambas as variedades. Ao longo deste trabalho houve necessidade de se proceder a duas extracções de PHS efectuadas em alturas diferentes. A composição físico-química das PHS de cada uma das extracções está indicada nas Tabelas 2.6 e 2.7. As PHS cuja caracterização é apresentada na Tabela 2.6 foram as PHS utilizadas no estudo dos sistemas amido+PHS (cap. VI) e glúten+amido+PHS (cap.VII). Para o estudo dos sistemas glúten+PHS (cap. V) foram utilizadas as PHS originais e as PHS purificadas cuja caracterização é apresentada na Tabela 2.7.

Tabela 2.6 - Caracterização^a físico-química das pentosanas hidrossolúveis extraídas das farinhas de trigo das variedades *Amazonas* (AMA) e *Sorraia* (SOR) - 1^a extracção - PHS utilizadas no estudo dos sistemas amido+PHS e glúten+amido+PHS

	AMA	SOR
Açúcares neutros totais (%)	77.9 ± 0.6	81.5 ± 0.4
Proteína residual (%)	13.3 ± 0.4	12.4 ± 0.3
[η], dL/g	2.24 ± 0.03	3.78 ± 0.04
Monossacarídeos:		
Ara:Xyl:Man:Gal:Glc	1.00:1.21: - :0.28:0.02	1.00:1.19:0.03:0.28:0.14
Ara/Xyl	0.83 ± 0.01	0.84 ± 0.01
(Ara/Xyl) _{corr} ^b	0.64	0.65
AX, %(m/m) ^c	52.4	50.7
AG, %(m/m) ^d	14.7	14.7

^aMédias de resultados em triplicado (excepto para os monossacarídeos - pelo menos quatro réplicas) com base em massa seca

^b(Ara/Xyl)_{corr} - razão arabinose / xylose corrigida : (%Ara - 0.7 x %Gal) / %Xil

^cAX - arabinoxilanas totais calculadas como AX=0.88 x [(%Ara-0.7 x %Gal) + %Xil]

^d AG - arabinogalactanas totais calculadas como AG = 0.89 x [(%Gal x 0.7) + %Gal]

Tabela 2.7 - Caracterização^a físico-química das pentosanas hidrossolúveis extraídas das farinhas de trigo das variedades *Amazonas* (AMA) e *Sorraia* (SOR) - 2ª extracção - PHS utilizadas no estudo dos sistemas glúten+ PHS

	AMA	SOR
Açúcares neutros totais (%)		
PHS originais	71,1 ± 1,0	73,6 ± 4,9
PHS purificadas com argila	86,0 ± 5,7	88,3 ± 1,8
Proteína residual (%)		
PHS originais	26,5 ± 0,9	20,9 ± 0,7
PHS purificadas com argila	4,6 ± 0,1	4,1 ± 0,3
[η], dL/g		
PHS originais	3,18 ± 0,02	3,02 ± 0,05
PHS purificadas com argila	3,82 ± 0,07	3,67 ± 0,18
Monossacarídeos (apenas para PHS purificadas com argila):		
Ara:Xil:Man:Gal:Glc	1,00:1,35: - :0.22:0.09	1,00:1,50: - :0.18:0.15
Ara/Xil	0,74 ± 0,03	0,67 ± 0,01
(Ara/Xil) _{corr} ^b	0,63 ± 0,04	0,58 ± 0,01
AX, %(m/m) ^c	65,9 ± 4,0	65,2 ± 1,6
AG, %(m/m) ^d	12,3 ± 1,9	8,5 ± 0,8

^aMédias de resultados em triplicado (excepto para os monossacarídeos - pelo menos quatro réplicas) com base em massa seca

^b(Ara/Xil)_{corr} - razão arabinose / xylose corrigida : (%Ara - 0.7 x %Gal) / %Xil

^cAX - arabinoxilanas totais calculadas como AX=0.88 x [(%Ara-0.7 x %Gal) + %Xil]

^d AG - arabinogalactanas totais calculadas como AG = 0.89 x [(%Gal x 0.7) + %Gal]

As amostras de PHS originais obtidas na segunda extracção (Tabela 2.7) apresentaram teores de proteína (20-26%) superiores aos das amostras de PHS obtidas na primeira extracção (12-13%) (Tabela 2.6). A composição em açúcares neutros totais foi semelhante entre as duas fracções, bem como a composição em monossacarídeos. A viscosidade intrínseca foi um pouco diferente o que deverá estar relacionado com o diferente conteúdo de proteína residual.

Relativamente às amostras da 2^a extração (Tabela 2.7), as amostras de PHS originais da variedade AMA apresentaram um teor de proteína residual (26,6%) ligeiramente superior às amostras da variedade SOR (20,9%). Estes valores estão de acordo com estudos realizados anteriormente por outros autores em amostras de pentosanas hidrossolúveis (Fincher e Stone, 1974; Ciacco e D'Appolonia, 1982; Faurot *et al.*, 1995), que referem conteúdos de proteína entre 20-60%. O tratamento das PHS com argila conduziu a uma diminuição em cerca de 80% do conteúdo em proteína residual, tendo as amostras purificadas apresentado 4,6% e 4,1% de proteína residual, respectivamente para as PHS das variedades AMA e SOR. Outros autores (Crowe e Rasper, 1988; Renard *et al.*, 1990; Izydorczyk e Biliaderis, 1995; Delcour *et al.*, 1999a) conseguiram igualmente reduzir o teor de proteína em amostras de PHS através da utilização de adsorventes semelhantes, tendo reportado valores entre 0 e 6% de proteína residual.

A diminuição do teor de proteína das amostras de PHS reflectiu-se num aumento do teor de açúcares neutros totais. Dado o erro experimental associado, não foram encontradas diferenças significativas relativamente ao conteúdo de açúcares neutros entre as PHS de ambas as variedades, tendo as amostras de PHS AMA e SOR purificadas apresentado 86,0% e 88,3% em açúcares neutros totais, respectivamente.

A composição em monossacarídeos foi relativamente semelhante entre as duas variedades, sendo ambas constituídas maioritariamente por arabinose (Ara) e xilose (Xil). As amostras de PHS da variedade SOR apresentaram uma maior proporção de resíduos de glucose (Glc), derivados possivelmente de contaminantes tais como amido residual e/ou β -glucanos. Os resultados revelam ainda a presença de galactose (Gal). Nas pentosanas, este monossacarídeo encontra-se geralmente sob a forma de arabinogalactanas, um biopolímero constituído por uma cadeia principal de unidades de galactose à qual se encontram ligados resíduos de arabinose. As arabinogalactanas e as arabinoxilanas representam os dois principais polímeros constituintes das pentosanas (Biliaderis *et al.*, 1992; Martinant *et al.*, 1999). Apesar de apresentarem uma quantidade de arabinoxilanas totais (AX) bastante semelhante (65,9% e 65,2% para as PHS AMA e SOR, respectivamente), as PHS purificadas provenientes da variedade AMA apresentaram uma maior razão arabinose/xilose (0,74) comparativamente às PHS da variedade SOR (0,67). A razão entre as concentrações de arabinose e xilose são uma indicação do grau de ramificação dos biopolímeros. Uma baixa razão reflecte a estrutura de uma cadeia de xilose com

relativamente poucas cadeias laterais de arabinose. Um biopolímero com um baixo grau de ramificação terá menos possibilidades de interação do que um biopolímero com maior grau de ramificação (Ciacco e D'Appolonia, 1982). No entanto, dado que a arabinose calculada contabiliza simultaneamente a arabinose proveniente das arabinoxilanas e das arabinogalactanas, determinou-se a razão Ara/Xil corrigida para a quantidade de arabinogalactanas presente (assumindo uma razão Ara:Gal constante), de modo a determinar com maior exactidão o grau de ramificação das arabinoxilanas (Loosveld *et al.*, 1997; Courtin e Delcour, 1998). Os valores calculados indicam uma razão Ara/Xil corrigida de 0,63 e de 0,58 para as PHS purificadas das variedades AMA e SOR, respectivamente, indicando que, também este parâmetro, não se mostrou significativamente diferente entre as duas amostras de PHS. Valores entre 0,5-0,83 foram encontrados em trabalhos publicados anteriormente por outros autores, relativamente à composição de arabinoxilanas do endosperma de trigo (D'Appolonia e MacArthur, 1975; Izydorczyk *et al.*, 1991; Delcour *et al.*, 1999b).

O tratamento das PHS com argila conduziu a um aumento da viscosidade intrínseca ($[\eta]$) em cerca de 20%. Na determinação da $[\eta]$ das amostras de PHS, as arabinoxilanas foram consideradas os principais contribuintes para a viscosidade das soluções de PHS, uma vez que as soluções de arabinogalactanas apresentam viscosidades bastante baixas, na ordem dos 0,05 dL/g (Izydorczyk *et al.*, 1991). A partir dos valores apresentados na Tabela 2.7 é possível verificar que as duas variedades de PHS apresentaram valores de viscosidade intrínseca ($[\eta]$) bastante próximos, dado o erro experimental associado. Estes resultados sugerem que as arabinoxilanas de ambas as variedades apresentam massas moleculares semelhantes uma vez que a $[\eta]$ pode ser utilizada como uma medida da massa molecular viscosimétrica de polímeros. De acordo com a equação de Mark-Houwink (§ I.2.1.3.2, eq.1.23) a $[\eta]$ pode ser relacionada com a massa molecular (M_w) dos polímeros. Quanto mais elevada for a M_w maior será o valor de $[\eta]$ (Flory, 1953). Os valores semelhantes observados para a viscosidade intrínseca das PHS das duas variedades sugere ainda que as PHS de ambas as variedades apresentam uma estrutura e uma conformação semelhante, provendo propriedades de fluxo equiparáveis.

Os valores de $[\eta]$ determinados para as PHS das variedades AMA e SOR estão de acordo com valores reportados anteriormente por outros autores, encontrando-se valores de $[\eta]$

entre 2-8,5 dL/g para arabinoxilanas de trigo (Ciacco e D'Appolonia, 1982; Izydorczyk *et al.*, 1991; Biliaderis *et al.*, 1992; Rouau *et al.*, 1994; Schoonveld-Bergmans *et al.*, 1999).

II. 4. Conclusões

Neste capítulo, descreveu-se o fracionamento das farinhas *Amazonas* e *Sorraia* nos seus diferentes constituintes. Com base na sua diferente densidade, obtiveram-se 5 fracções diferentes: glúten, amido, fibras, resíduos de amido e hidrossolúveis.

A caracterização físico-química das farinhas apresentou como principais diferenças entre as farinhas das duas variedades os teores mais elevados de amido e amido danificado para a farinha SOR.

Os glúten obtidos a partir do fracionamento das farinhas de ambas as variedades não apresentaram diferenças significativas na sua composição físico-química. O glúten da variedade AMA apenas apresentou um teor de proteína ligeiramente superior ao glúten da variedade SOR.

A caracterização físico-química do amido de ambas as variedades revelou a presença de uma maior percentagem de amido danificado e de lípidos livres no amido da variedade SOR. O amido da variedade AMA apresentou uma menor percentagem de lípidos internos conjuntamente com um menor teor de amilose. A análise de distribuição de tamanhos mostrou que os amidos de ambas as variedades apresentaram uma distribuição bimodal de grânulos. O amido SOR apresentou grânulos tipo A de maior diâmetro e grânulos tipo B de menor diâmetro do que o amido AMA.

As pentosanas hidrossolúveis apresentaram uma composição físico-química semelhante entre as duas variedades. O tratamento das PHS com argila diminuiu bastante o teor de proteína residual, o que se reflectiu no aumento do teor de açúcares neutros totais. A viscosidade intrínseca foi semelhante entre as PHS das duas variedades. A diminuição do teor de proteína residual nas PHS conduziu a um aumento da viscosidade intrínseca. Apesar das características de ambas as PHS serem semelhantes, as PHS da variedade AMA apresentaram viscosidade intrínseca e razão Ara/Xil ligeiramente superiores, provavelmente associado a uma maior massa molecular e a um grau de ramificação ligeiramente superior.

CAPÍTULO III

PROPRIEDADES REOLÓGICAS E ESPECTROSCÓPICAS DAS FARINHAS DE TRIGO *AMAZONAS* E *SORRAIA*



III. 1. Introdução

A farinha de trigo é o principal ingrediente utilizado no fabrico do pão. Entre todas as farinhas produzidas a partir de outros cereais, a farinha de trigo é a única que consegue produzir uma massa coesa com propriedades viscoelásticas adequadas à panificação (Schofield e Scott Blair, 1932; Hibberd e Parker, 1975; Bushuk, 1985; Hosney e Rogers, 1990; Janssen *et al.*, 1996a). A singularidade exibida pelas massas de farinha de trigo deve-se à presença das proteínas do glúten que, graças ao seu carácter hidrofílico e às propriedades estruturais que apresentam, hidratam e estabelecem interações quer entre si, quer com outros constituintes da farinha, conferindo assim a viscoelasticidade típica das massas obtidas a partir da hidratação de farinhas de trigo.

Durante a preparação de uma massa para panificação, o processo de mistura de água e de farinha tem como consequência a transformação do glúten numa rede macromolecular homogénea, na qual se incorporam grânulos de amido e outros constituintes menores. A massa de farinha transforma-se num sistema viscoelástico, complexo e interactuante, cuja composição e grau de hidratação representam factores decisivos para a sua estrutura e propriedades mecânicas. Durante o processo de panificação, a análise destas propriedades reveste-se de elevada importância não só para o processamento a que se sujeita o sistema, como também para a determinação da qualidade dos produtos finais obtidos. O estudo das propriedades reológicas torna-se um elo de ligação bastante importante entre a composição e a estrutura dos elementos base da farinha e as suas propriedades funcionais.

O estudo da reologia das massas de farinha de trigo tem sido o tópico principal de muitos trabalhos de investigação que ao longo de algumas décadas têm contribuído para o avanço tecnológico e melhoria dos produtos de panificação. Muitos estudos têm sido conduzidos de modo a estabelecer a melhor relação entre as propriedades mecânicas e a textura final dos produtos e a qualidade das farinhas de trigo através de aparelhos tais como o mixógrafo ou farinógrafo (Finney e Shogren, 1972; MacRitchie, 1985; Roussel, 1993; Mikhaylenko *et al.*, 2000), e o alveógrafo (Launay e Buré, 1977; Roussel, 1993; Brites e Bagulho, 1999). Os testes realizados por estes aparelhos são testes semi-empíricos que providenciam informação útil sobre a força e a funcionalidade de uma farinha de trigo, o que está relacionado com a estrutura macroscópica da massa (Bushuk, 1985). Porém, devido às elevadas deformações que

normalmente são aplicadas às amostras, estes métodos não têm a capacidade de fornecerem informação relativamente às interações entre os componentes que ocorrem ao nível microscópico e molecular, e precisam de uma grande quantidade de amostra, o que pode ser uma desvantagem quando a quantidade de amostra é um factor limitante (Edwards *et al.*, 1999). Quando as propriedades reológicas são medidas de modo a se perceber a estrutura da massa, outras medições sob condições de deformação moderadas devem ser utilizadas de modo a que a estrutura do material não seja destruída (Bloksma, 1990; Amemiya e Menjivar, 1992).

Medições de reologia fundamental têm sido usadas na caracterização da microestrutura e do comportamento reológico de massas de farinha. Estas medições têm incluído testes de oscilação dinâmica (Hibberd e Wallace, 1966, Smith *et al.*, 1970; Parker e Hibberd, 1974; Hibberd e Parker, 1975; Navickis *et al.*, 1982; Dreese *et al.*, 1988a, 1988b; He e Hosney, 1991; Amemiya e Menjivar, 1992; Berland e Launay, 1995; Petrofsky e Hosney, 1995; Janssen *et al.*, 1996a, Campos *et al.*, 1997; Wehrle *et al.*, 1997; Hosney, 1998; Leonard *et al.*, 1999; Uthayakumaran *et al.*, 2000; Beasley *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001), testes de deformação-relaxação (Launay e Buré, 1974, Fu *et al.*, 1997) e testes de fluência (Hibberd e Parker, 1979; Campos *et al.*, 1997; Wang e Sun, 2002).

Os testes de oscilação dinâmica têm sido os mais utilizados no estudo das propriedades mecânicas fundamentais das farinhas de trigo, tendo a sua aplicação iniciado com os estudos de Hibberd e Wallace (1966) e Hibberd (1970). Alguns investigadores reportaram a dependência do comportamento reológico das massas de farinha com a percentagem de deformação (Hibberd e Wallace, 1966; Smith *et al.*, 1970; Parker e Hibberd, 1974; Hibberd e Parker, 1975; Dreese *et al.*, 1988b; Amemiya e Menjivar, 1992) referindo a importância da realização dos ensaios de oscilação na zona viscoelástica linear. Resultados de estudos realizados por outros autores indicaram que o comportamento reológico das massas de farinha é uma função de vários factores, tais como o grau de hidratação (Smith *et al.*, 1970; Navickis *et al.*, 1982; Dreese *et al.*, 1988b; Sharma, 1990; Phan-Tiene Safari-Ardi, 1998; Beasley *et al.*, 2000), a quantidade de energia aplicada (Bohlin e Carlson, 1980; Campos *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2001), a temperatura (Hibberd e Parker, 1975; Dreese *et al.*, 1988a) e a composição (Navickis *et al.*, 1982; Dreese *et al.*, 1988b; Janssen *et al.*, 1996b; Wehrle *et al.*, 1997; Larsson *et al.*, 2000; Uthayakumaran *et al.*, 2000; Edwards *et al.*, 2001).

Os testes de oscilação conduzidos a baixa amplitude de deformação têm assim demonstrado ser bastante sensíveis à estrutura do material. Porém, a caracterização quantitativa do comportamento reológico fundamental das massas de farinha tem-se mostrado complicada devido ao seu comportamento viscoelástico não linear (Parker e Hibberd, 1974; Hibberd e Parker, 1975; Dreese *et al.*, 1988b), pelo que, embora muito trabalho tenha sido feito na área da reologia das farinhas de trigo, a compreensão exacta das propriedades mecânicas das massas de farinha e o porquê do seu comportamento não são ainda totalmente compreendidas.

A caracterização de massas de farinha ao nível molecular pode ser realizada recorrendo a técnicas espectroscópicas. Trabalhos publicados anteriormente utilizaram a espectroscopia de infravermelho (FT-IR) (Grant *et al.*, 1999) e a espectroscopia de ressonância paramagnética de electrão (EPR) (Lee, 1962; Windle e Evans, 1971; Windle *et al.*, 1976; Koh *et al.*, 1996; Schaich e Rebello, 1999; Belton *et al.*, 1999) para o estudo do efeito da mistura ou da temperatura em massas de farinha de trigo. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) do estado sólido surge como outra técnica espectroscópica de elevado potencial, uma vez que consegue fornecer informação bastante útil sobre a estrutura e a dinâmica de muitos sistemas biológicos (Gil e Geraldès, 1987). Alguns trabalhos foram já realizados sobre a utilização da espectroscopia de RMN no estudo da distribuição da água nas massas de farinha (Leung *et al.*, 1979, 1983; D'Avignon *et al.*, 1990; Räsänen *et al.*, 1995), na caracterização de farinhas (Baianu e Forster, 1980; Sacco *et al.*, 1998) ou no estudo da estrutura do glúten (Schofield e Baianu, 1982; Belton *et al.*, 1988a, Alberti *et al.*, 2000; Gil *et al.*, 2001). Porém, ao nível molecular, ainda muito pouco é sabido sobre o modo como os componentes da farinha interactivam entre si e, especialmente, o que acontece às massas de farinha de trigo quando são transformadas em pão, i.e. quando são aquecidas.

O comportamento das massas ao nível reológico fundamental está relacionado com o comportamento ao nível molecular. A conjugação de técnicas que forneçam informação ao nível da dinâmica molecular e estrutural apresenta uma grande potencialidade para a melhor compreensão das propriedades funcionais das farinhas. A combinação de estudos de reologia e de RMN em amostras de farinha não foi ainda reportada. Assim, o trabalho apresentado neste capítulo surge como uma tentativa de

correlacionar os resultados da caracterização reológica e espectroscópica de farinhas provenientes de duas variedades portuguesas de trigo com propriedades tecnológicas distintas, tendo como objectivo a determinação de aspectos diferenciadores da diferente funcionalidade destas duas farinhas, ao nível estrutural fundamental e ao nível molecular.

As farinhas foram estudadas no seu estado original e após deslipidificação. A caracterização reológica foi efectuada através de ensaios de oscilação a baixa amplitude de deformação, na zona viscoelástica linear. O comportamento viscoelástico das farinhas foi estudado através de ensaios de varrimento de frequência. A simulação do processo de cozimento do pão foi estudada através de ensaios de varrimento de temperatura. A caracterização espectroscópica foi efectuada através de estudos de espectroscopia de RMN de sólidos, adquirindo-se espectros de $^1\text{H}/\text{MAS}$, $^{13}\text{C}\text{-CP}/\text{MAS}$ e $^{13}\text{C}\text{-SPE}$. A dinâmica dos sistemas de massa de farinha durante o tratamento térmico foi igualmente estudada através dos tempos de relaxação longitudinal ($T_{1\text{H}}$) e relaxação transversal ($T_{2\text{H}}$).

III. 2. Materiais e Métodos

III. 2.1. Farinhas

As farinhas utilizadas neste estudo foram provenientes de grãos de duas variedades portuguesas de trigo, *Amazonas* (AMA) e *Sorraia* (SOR), correspondentes a uma farinha do tipo mole e a uma farinha do tipo duro, respectivamente. A caracterização destas farinhas foi descrita anteriormente (§ II.3.1).

III. 2.2. Preparação das amostras

As amostras de farinha hidratada foram preparadas por dois métodos diferentes, obtendo-se no final amostras homogéneas com diferente grau de desenvolvimento da massa. Em ambos os métodos, as amostras foram hidratadas numa proporção de 1:1, resultando um teor final de 50% (m/m) de água. Para a análise por espectroscopia de

RMN, utilizou-se D₂O. Por conveniência prepararam-se amostras de 2g para a caracterização reológica e 0,4 g para a caracterização por RMN.

Método 1 - “Massa desenvolvida” - Adicionou-se a massa de água pretendida a uma determinada massa de farinha ($\pm 0,0001$ g), misturando o conjunto durante 3 minutos, num tubo de ensaio de vidro, com o auxílio de uma vareta de vidro longa e de um motor. Esta vareta foi especialmente desenhada para o efeito (Figura 3.1) e fabricada na oficina de vidro da Universidade de Aveiro. Após preparação, a amostra foi deixada em repouso durante duas horas à temperatura ambiente.

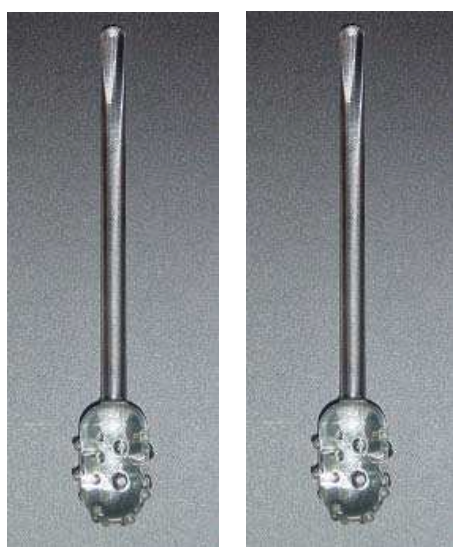


Figura 3.1 - vareta de vidro + amostra+tubo (Falta fotografia de vareta+tubo)

Método 2 - “Massa não desenvolvida” - As amostras foram preparadas de acordo com o método previamente descrito por Campos *et al.* (1997), modificado e adaptado às condições laboratoriais existentes. Uma certa quantidade de pó de gelo foi preparada por congelação, em azoto líquido, de pequenas gotículas de água colocadas em folha de alumínio, e depois transferidas para um almofariz, previamente arrefecido por imersão em azoto líquido, onde foram moídas e reduzidas a gelo pulverizado. A massa de gelo em pó (água) pretendida foi transferida para um pequeno recipiente de vidro imerso em azoto líquido. A massa de farinha necessária para a proporção 50% (m/m) foi transferida para o recipiente de vidro que continha o gelo em pó. Os dois pós foram cuidadosamente misturados, com a ajuda de uma espátula arrefecida, até se

obter uma mistura homogénea. Seguidamente, a mistura foi quantitativamente transferida para um tubo de ensaio, previamente arrefecido e mergulhado em azoto líquido. A mistura dos dois pós foi agitada em vórtex a baixa velocidade durante 15 s e ficou depois em repouso durante 20 horas. A amostra final encontrava-se homogénea e bem hidratada.

III. 2.3. Caracterização Reológica das Farinhas de Trigo

O estudo do comportamento reológico das farinhas de trigo foi realizado num reómetro de tensão controlada (AR-1000, TA Instruments, New Castle, DE), equipado com uma geometria de placas paralelas, de superfície rugosa (4 cm de diâmetro e distância de separação de 2 mm).

Após a sua preparação, as amostras foram cuidadosamente transferidas para a placa do reómetro. Após o posicionamento da geometria sobre a amostra, o excesso de amostra foi eliminado com a ajuda de uma lâmina. No sentido de minimizar as perdas de água por evaporação, as margens de amostra mais expostas foram cobertas com um óleo mineral de baixa viscosidade ($d=0.84$ g/mL, Sigma-Aldrich Química SA, Sintra, Portugal). Em testes preliminares verificou-se que o óleo usado não apresentava alguma influência significativa sobre os parâmetros reológicos registados. Depois de colocada no reómetro, a amostra ficou em repouso durante 30 min antes de se iniciar qualquer tipo de teste, possibilitando assim o relaxamento de qualquer tensão residual, transmitida à amostra durante a sua manipulação.

Para a análise do comportamento reológico das farinhas realizaram-se ensaios dinâmicos a baixa amplitude de deformação e ensaios de escoamento a tensão de corte constante.

Os ensaios dinâmicos a baixa amplitude de deformação realizaram-se na zona de comportamento viscoelástico essencialmente linear, como definido mais à frente (§ III.3.2.1), e envolveram a realização de diferentes ensaios.

Para avaliação do comportamento da amostra em função do tempo, após preparação, realizaram-se medições dos módulos viscoelásticos em função do tempo, a frequência de oscilação e temperaturas constantes (0,5 Hz, 20°C). Para avaliação do comportamento viscoelástico das amostras, antes e depois do tratamento térmico a

que foram submetidas, realizaram-se ensaios de varrimento de frequência entre 0,005 e 50 Hz, a 20°C. Para avaliação do comportamento reológico das amostras durante o tratamento térmico, realizaram-se ensaios de varrimento de temperatura entre 20°C e 80°C (ou 95°C), a uma taxa de variação de temperatura de +2°C/min, mantendo a amostra à temperatura limite máxima (80°C ou 95°C) durante 10 min, e depois arrefecendo-a à mesma taxa de variação de temperatura (-2°C/min) até 20°C, a uma frequência de oscilação constante de 0,5 Hz. Os parâmetros reológicos de interesse foram os módulos complexo ($|G^*|$), de conservação (G') e de perda (G'') e a tangente ao ângulo de perda ($\tan \delta$), como definidos anteriormente (§ I.2.1.2.1).

Para as amostras de farinha hidratadas à temperatura ambiente, após preparação, realizaram-se ensaios de escoamento a tensão de corte constante, como ensaios complementares de comparação entre as diferentes amostras de farinha, sujeitando as amostras, neste caso, a deformações elevadas, para além do limite de comportamento linear. Os ensaios realizaram-se a 20°C, após 30 min de colocação da amostra no reómetro, sujeitando a amostra a uma tensão de corte constante (entre 50 e 150 Pa) e acompanhando o comportamento da amostra durante 30 min, medindo-se a taxa de corte resultante e a respectiva viscosidade aparente.

III. 2.4. Caracterização das Farinhas de Trigo por RMN do estado sólido

Os espectros de carbono (^{13}C -CP/MAS e ^{13}C -SPE) e de protão (^1H -MAS) foram obtidos num espectrómetro Bruker DRX 4000, operando a uma frequência de campo B_0 de 100.6 MHz para o carbono e 400 MHz para o protão, utilizando uma sonda Bruker de polarização cruzada e com rotação segundo o ângulo mágico (CP/MAS) de 4 mm. As amostras foram colocadas num rotor de 4 mm tapado com uma tampa de cerâmica, possibilitando assim a realização de ensaios a temperaturas elevadas, até 80°C. O rotor foi pesado antes e depois da aquisição por RMN para verificar a possibilidade de perdas de água por evaporação. A variação de massa foi nula ou praticamente desprezável (<0,001g), concluindo-se que não ocorreram perdas de água significativas por evaporação.

Os espectros de ^{13}C - CP/MAS foram registados utilizando impulsos de 90° de 4-5 μs e com um tempo de intervalo entre scans de 4 s, a uma velocidade de rotação de 5 kHz. Os espectros ^{13}C -SPE foram registados utilizando o intervalo entre scans de 5 s

de modo a seleccionar os carbonos de maior mobilidade. Os espectros de ^1H foram registados utilizando impulsos de 90° de 3-5 μs , um tempo de intervalo entre ciclos de 2-5s e a uma velocidade de rotação de 5-6 kHz.

Os tempos de relaxação $T_{1\text{H}}$ foram obtidos usando a sequência de “inversão-recuperação” ($180^\circ_x - \tau - 90^\circ_x$). Utilizaram-se 12 a 14 valores de tempo entre pulsos, numa gama de 0,01-15s, e a uma velocidade de rotação de 5 kHz. Os valores de $T_{1\text{H}}$ foram calculados por ajuste exponencial das intensidades $I(\tau)$ dos picos do espectro registadas, versus o tempo de intervalo entre pulsos (τ), de acordo com a equação eq.1.33 (§ I. 2.2.3.2).

Os tempos de relaxação $T_{2\text{H}}$ foram obtidos usando a sequência de pulsos Carr-Purcell-Meiboom-Gill ($90^\circ_x - \tau - 180^\circ_y$). Utilizaram-se 12 a 14 valores de tempos entre pulsos, numa gama de 0,01-60ms, e a uma velocidade de rotação de 5 kHz. Os valores de intensidade (A) de cada pico foram representados graficamente em função do tempo de intervalo entre pulsos (τ). O comportamento de relaxação foi descrito por uma das equações eq.3.1 e eq.3.2:

$$A = a \exp(-\tau / T_{2\text{H}}) \quad \text{eq. 3.1}$$

$$A = a \exp(-\tau / T_{2\text{A}}) + b \exp(-\tau / T_{2\text{B}}) \quad \text{eq. 3.2}$$

A função bi-exponencial representada pela equação 3.2 fornece dois valores de tempos de relaxação, $T_{2\text{A}}$ e $T_{2\text{B}}$, onde a e b representam as proporções relativas de cada fracção correspondentes aos valores de $T_{2\text{A}}$ e $T_{2\text{B}}$, respectivamente. Os valores de $T_{2\text{A}}$ caracterizam as fracções de protões mais rígidos, sendo, portanto, valores de tempo mais curtos. Os valores de relaxação $T_{2\text{B}}$ são mais longos, representando por isso as fracções de protões mais móveis. Os valores de $T_{1\text{H}}$ e de $T_{2\text{H}}$ são apresentados em tabelas, seguidos de um erro associado, o qual indica o desvio dos pontos experimentais à linha de ajuste exponencial para cada um dos sinais.

Os ensaios de temperatura foram realizados para temperaturas na gama 20-80°C. A temperatura foi controlada utilizando uma unidade de aquecimento VT (B-VT Bruker

2000), com uma variação de $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$. As amostras foram aquecidas directamente dentro da sonda e permaneceram no mínimo 15 min a cada temperatura, antes da aquisição, para atingir o equilíbrio.

III. 3. Resultados e Discussão

III. 3.1. Comportamento das farinhas aquando da hidratação

Aquando da preparação das massas pelos dois métodos diferentes, e por simples análise visual, verificou-se que, para o mesmo método de preparação, as duas variedades de farinha produziram massas com características de textura diferentes. Durante a preparação das amostras, a farinha AMA produziu uma massa mais pastosa e menos consistente do que a farinha SOR, o que estará relacionado com a diferente capacidade de absorção de água destas duas farinhas. Com efeito, de acordo com os resultados fornecidos pela Estação Nacional de Melhoramento de Plantas de Elvas (ENMP), com base em medições utilizando um consistógrafo Chopin, as farinhas em estudo apresentaram capacidades de absorção de água diferentes. Para a mesma consistência da massa, a farinha SOR necessita de um maior teor de água adicionada, apresentando assim uma maior capacidade para absorção de água - os resultados obtidos foram 58,2% para a farinha SOR (significando uma quantidade de 58.2 g de água por 100 g de farinha, para obtenção de determinada consistência da massa) e 53,5% para a farinha AMA. Assim, parece coerente que a adição da mesma quantidade de água, a farinhas com capacidades de absorção diferentes, origine massas com consistências diferentes.

Foi previamente descrito que farinhas com diferente grau de dureza apresentam capacidades diferentes de absorção de água (Martinant *et al.*, 1998). Quanto maior for o grau de dureza, maior é a percentagem de amido danificado e, portanto, maior é a capacidade de absorção de água (Farrand, 1964; Pomeranz e Williams, 1990; Eliasson e Larsson, 1993; Bushuk, 1998) A dureza do endosperma resulta, principalmente, das interações entre os seus principais constituintes, nomeadamente entre o amido e a matriz proteica (Simmonds *et al.*, 1973; Barlow *et al.*, 1973; Bettge e Morris, 2000).

Nos trigos de carácter duro, a proteína está fortemente aderente às paredes dos grânulos de amido, envolvendo-os completamente, enquanto que nos trigos de carácter mole, a interacção entre a matriz proteica e os grânulos de amido é mais fraca (Glenn e Saunders, 1990; Bushuk, 1998; Bettge e Morris, 2000).

A maior capacidade de absorção de água da farinha SOR está, assim, de acordo com outras características desta farinha, nomeadamente com a maior dureza do grão e com o maior teor em amido danificado (ver § II.3.1). Como já anteriormente referido, a variedade SOR corresponde a uma farinha do tipo duro. De facto, de acordo com resultados fornecidos pela ENMP, com base em medições por reflectância de infravermelho próximo (NIR), os grãos das variedades em estudo apresentaram durezas diferentes: A variedade AMA apresentou um menor grau de dureza (índice 23) do que a variedade SOR (índice 84).

III. 3.2. Caracterização Reológica

A caracterização reológica das farinhas hidratadas realizou-se para amostras após preparação (20 °C), durante um ciclo de aquecimento e arrefecimento (20-80-20 °C) e, novamente a 20 °C, após este tratamento térmico.

Com o estudo do comportamento reológico realizado pretendeu-se investigar três factores principais: 1) A influência, já esperada, do método de preparação das amostras hidratadas; 2) A influência da deslipidificação das farinhas; e, principalmente, 3) a influência da origem varietal das farinhas estudadas, para as quais são conhecidas as diferentes propriedades tecnológicas que possuem.

O comportamento alveográfico destas duas farinhas, avaliado pela Estação Nacional de Melhoramento de Plantas (Elvas), é apresentado na Tabela 3.1, por se julgar pertinente a consideração dos parâmetros alveográficos na interpretação da caracterização reológica efectuada neste trabalho.

Tabela 3.1. - Parâmetros obtidos a partir de alveogramas para as duas farinhas em estudo - resultados fornecidos pela Estação Nacional de Melhoramento de Plantas ^(*)

Parâmetros	AMA		SOR	
	(A)	(B)	(A)	(B)
W ($\times 10^4$ J)	318	269	398	266
P (mm)	70	56	156	76
L (mm)	125	132	80	132
P/L	0.56	0.43	1.99	0.57

^(*) Valores de tenacidade (P), extensibilidade (L) e de força do glúten (W) determinados a hidratação constante (A) ou a consistência da massa constante (B), em alveógrafo Chopin (Chopin AS, France).

III. 3.2.1. Identificação da zona de comportamento viscoelástico linear

A caracterização reológica das farinhas hidratadas após preparação iniciou-se pelo estudo da sensibilidade à tensão sinusoidal imposta e pela definição da zona de comportamento viscoelástico linear, na qual se assume que a deformação a que se sujeita o sistema não influencia o seu comportamento. Com base em ensaios de varrimento de tensão sinusoidal aplicada, verificou-se a elevada sensibilidade à deformação imposta e a existência de uma zona muito estreita de valores de tensão/deformação para a qual se pode considerar que as amostras apresentam comportamento viscoelástico linear. A Figura 3.2. apresenta exemplos deste comportamento, para amostras de farinha AMA.

O valor de amplitude de deformação limite, até ao qual se considera a existência de comportamento viscoelástico linear, e definido aqui como o valor correspondente a 95% do valor inicial do módulo, foi semelhante para as amostras (AMA ou SOR, com ou sem lípidos) preparadas pelo método 2, entre 0.04% e 0.08%, e ligeiramente superior para as amostras preparadas pelo método 1, especialmente para a farinha AMA (0.11-0.13%). Após o tratamento térmico (aquecimento a 80 ou 95°C, seguido de arrefecimento até 20°C), o valor de amplitude de deformação limite foi igualmente superior, tendo a zona linear atingido a gama de 0.3-0.4%.

Atendendo a estes resultados, e considerando os valores de deformação acima dos quais se conseguiram sinusoidais bem resolvidas, optou-se por trabalhar a uma amplitude de deformação de 0.05%.

Este comportamento, ou seja a elevada sensibilidade à deformação imposta verificada, foi já anteriormente descrito para farinhas de trigo hidratadas e desenvolvidas, tendo, por exemplo, Hibberd e Wallace (1966) reportado um valor de deformação limite $\gamma = 4,4 \times 10^{-3}$. Hibberd (1970) e Phan-Thien *et al.* (1997) reportaram que a zona de comportamento viscoelástico linear se encontrava para valores de deformação $\gamma \leq 10^{-3}$.

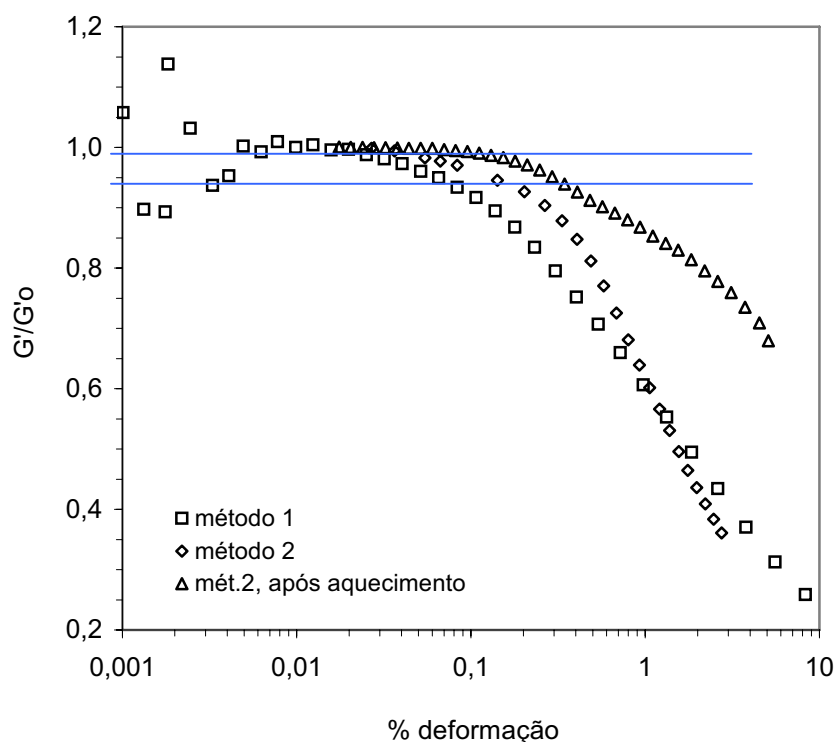


Figura 3.2 - Valores de módulo de conservação relativo (G'/G'_0) em função da amplitude de deformação imposta (γ , %), para amostras de farinha AMA não deslipidificada, ensaiadas após preparação de acordo com os dois métodos descritos no texto e após aquecimento/arrefecimento no reómetro (20-80-20°C). G'_0 corresponde ao valor do módulo inicial, para os mais baixos valores de deformação ensaiados.

III. 3.2.2. Caracterização das amostras hidratadas à temperatura ambiente

Para a caracterização das amostras de farinha-água após preparação pelos métodos 1 ou 2, recorreu-se a ensaios dinâmicos a baixa amplitude de deformação e a ensaios de escoamento a tensão de corte constante, estes últimos sujeitando a amostra, necessariamente, a maiores deformações, para além do regime linear.

Conforme referido anteriormente (§ III.2.3), depois de colocada no reómetro a amostra ficou em repouso durante 30 min antes de se iniciar qualquer tipo de teste, possibilitando assim o relaxamento de qualquer tensão residual. Verificou-se que este intervalo de tempo era necessário e suficiente para se verificar uma variação praticamente desprezável nos módulos viscoelásticos com o tempo e para a obtenção de resultados mais reprodutíveis (Figura 3.3a).

Para todas as amostras estudadas, os valores do módulo de conservação ($G'(\omega)$) foram mais elevados do que os valores do módulo de perda ($G''(\omega)$), revelando um comportamento característico de materiais altamente estruturados, onde predomina o carácter sólido do sistema. Na Figura 3.3b apresenta-se um espectro mecânico obtido para uma amostra de farinha SOR deslipidificada, como exemplo representativo do comportamento geral observado.

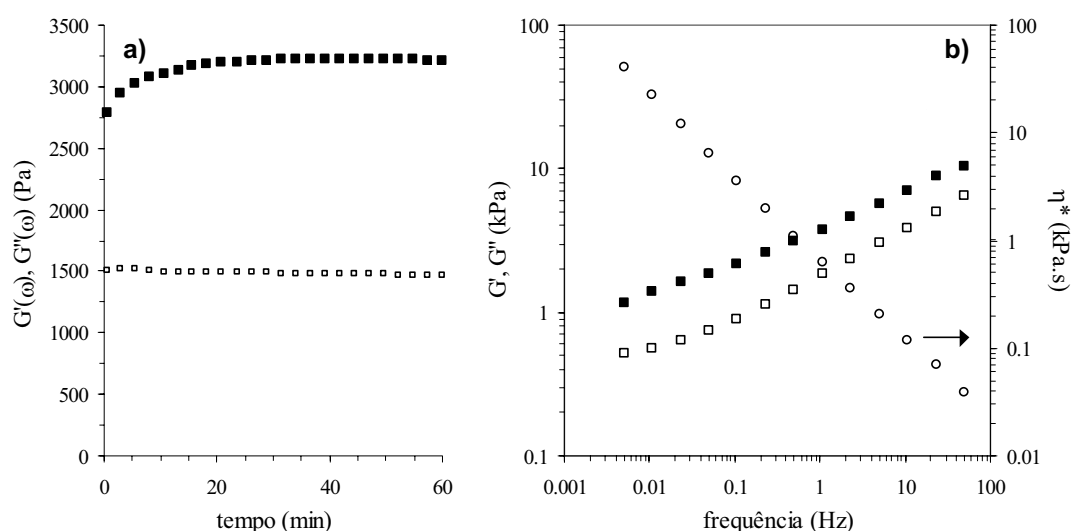


Figura 3.3 - Comportamento viscoelástico de uma farinha SOR deslipidificada a 50% (m/m) de hidratação ($\gamma=0,05\%$, 20°C); a)- Módulos viscoelásticos ($\blacksquare G'$, $\square G''$) em função do tempo, após colocação no reómetro; b)- Espectro mecânico ($\square G'$, $\square G''$, $\circ \eta^*$) para a mesma farinha após 1 h no reómetro.

Todas as amostras apresentaram uma dependência dos módulos viscoelásticos com a frequência, aumentando o valor destes com o aumento da frequência. Este tipo de dependência dos módulos dinâmicos com a frequência e a diferença relativamente pequena entre eles, é demonstrativo de sistemas viscoelásticos onde as interações

intermoleculares apresentam limitado tempo de vida, conferindo mobilidade apreciável aos componentes macromoleculares do sistema. Comportamento semelhante foi igualmente referido por outros autores para massas obtidas com farinha de trigo e água (Hibberd e Wallace, 1966; Smith et al, 1970; Cumming e Tung, 1977; Amemiya e Menjivar, 1992; Campos *et al.*, 1997, Miller e Hosney, 1999). A viscosidade complexa (η^*) apresentou uma elevada dependência face à frequência, apresentando um comportamento reofluidificante típico de um sistema sólido viscoelástico, não apresentando, nesta gama de frequências, qualquer tendência para patamar newtoniano.

O comportamento viscoelástico das farinhas das variedades SOR e AMA, hidratadas (50% m/m) e preparadas de acordo com os métodos 1 ou 2, é apresentado na Figura 3.4. São apresentados os resultados para o módulo complexo ($|G^*|(\omega)$), indicativo da estruturação geral do sistema, e para a tangente ao ângulo de perda ($\tan \delta = G''(\omega)/G'(\omega)$), indicativa do carácter elástico/viscoso relativo do sistema.

A farinha SOR apresentou valores de G^* mais elevados do que a farinha AMA (Figura 3.4a), o que parece confirmar que farinhas provenientes de trigos duros formam massas mais estruturadas, com maior resistência à deformação, do que farinhas provenientes de trigos moles (Hosney e Rogers, 1990). O maior valor do módulo apresentado pela variedade SOR está de acordo com os resultados obtidos pelos ensaios alveográficos (Tabela 3.1 - resultados fornecidos pela ENMP) os quais demonstraram que a farinha SOR dá origem a massas com valores mais elevados de força e tenacidade, apesar dos dois tipos de ensaios implicarem regimes muito diferentes de deformação imposta ao sistema.

Para todas as amostras, o valor de $\tan \delta (= G''/G')$ foi inferior a um, manifestando um carácter predominantemente mais elástico do que viscoso ($G' > G''$). Comparando as curvas da variação da tangente ao ângulo de perda ($\tan \delta$) com a frequência (Figura 3.4b), verificou-se que o comportamento foi semelhante para as duas variedades, quando preparadas pelo mesmo método, ou seja, as duas farinhas hidratadas apresentaram um carácter elástico semelhante, excepto a frequências elevadas, condições para as quais a massa de farinha AMA não desenvolvida, exibiu um

carácter viscoso mais acentuado ($\tan \delta$ mais elevada). Esta diferença pode estar associada à maior extensibilidade exibida por esta amostra (Tabela 3.1).

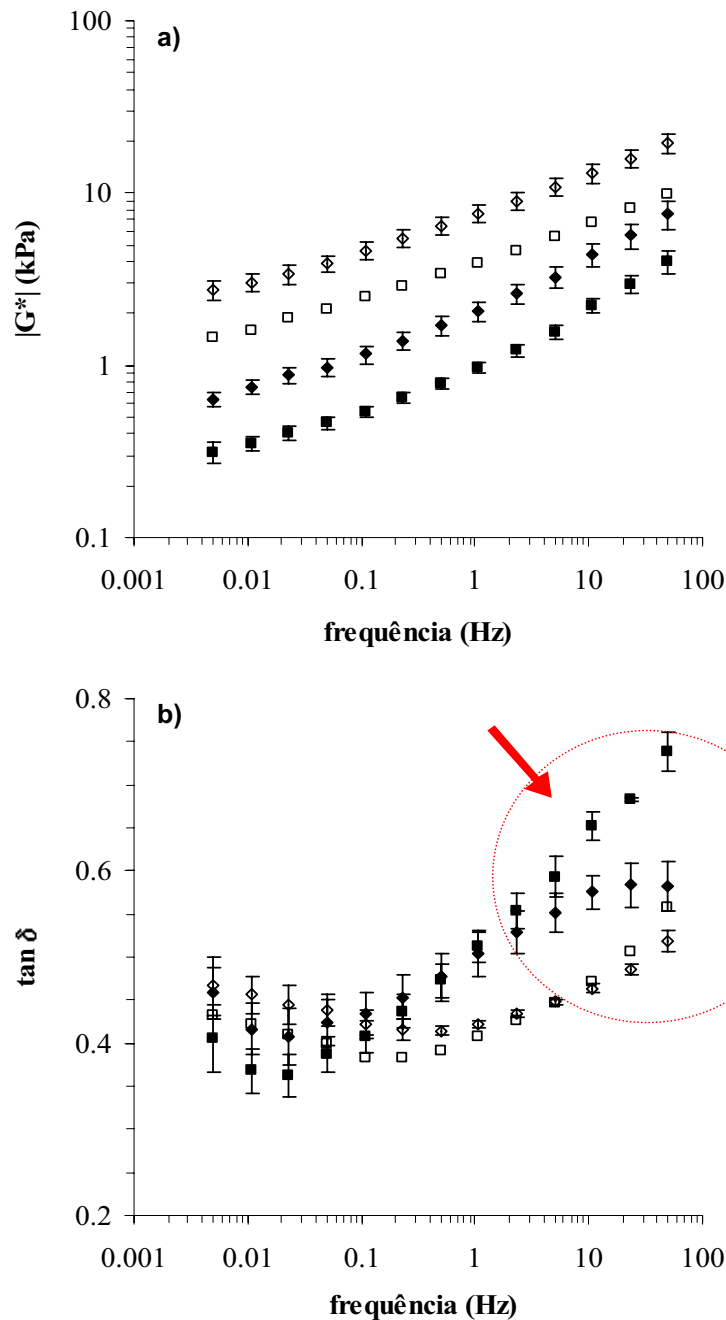


Figura 3.4 - Comportamento viscoelástico das farinhas Amazonas (■, □) e Sorraia (◇, ◇) a 50% m/m) de hidratação ($\gamma=0.05\%$, 20°C). a) - variação do módulo complexo, $|G^*|$ (kPa), e b) - variação da tangente ao ângulo de perda, $\tan \delta$, com a frequência de oscilação (ω). Os símbolos abertos representam amostras preparadas pelo método 1 e os símbolos cheios representam amostras preparadas pelo método 2. Os resultados apresentados correspondem a curvas médias obtidas em três ensaios. As barras de erro apresentadas correspondem aos valores de desvio padrão obtidos.

A relação entre o comportamento viscoelástico das massas e o grau de dureza das farinhas (grão) foi objecto de diversos estudos, embora os resultados descritos apresentem discrepâncias apreciáveis. Amemiya e Menjivar (1992), Campos *et al.* (1997), Miller e Hosney (1999) e Edwards *et al.* (1999) referiram valores de G' e G'' mais elevados para variedades de trigo duro, enquanto que Glenn e Johnston (1992) concluíram não existir grande diferença entre os módulos viscoelásticos, quando comparando farinhas de trigo duro e farinhas de trigo mole. Campos *et al.* (1997) e Edwards *et al.* (1999) referiram valores de $\tan \delta$ semelhantes entre farinhas de variedades de trigo mole e trigo duro mas Miller e Hosney (1999) referiram valores de $\tan \delta$ mais baixos para variedades de trigo duro.

Para as farinhas hidratadas à temperatura ambiente, não desenvolvidas (preparadas pelo método 2), realizaram-se ensaios viscosimétricos (Figura 3.5), por aplicação de uma tensão constante às amostras e acompanhando o comportamento da amostra em função do tempo, medindo-se a taxa de corte resultante e a respectiva viscosidade aparente. Verificou-se que para estes sistemas não é atingido um regime de escoamento estacionário, pelo menos para os intervalos de tempo analisados, conforme já descrito anteriormente para sistemas de farinha/água desenvolvidos (Phan-Thien *et al.*, 1997).

A Figura 3.5a mostra o comportamento observado para as farinhas AMA e SOR, não deslipidificadas, quando sujeitas a uma tensão de corte constante de 50 Pa. Para este regime de tensão/deformação é evidente o diferente comportamento entre as duas amostras. O valor de tensão aplicada foi suficiente para provocar o escoamento do sistema, caracterizado por possuir tensão de inércia, verificando-se, inicialmente, um aumento da resistência ao escoamento, ou seja, um aumento de viscosidade, com o tempo de aplicação da tensão. As alterações estruturais do sistema levaram, para esta tensão aplicada, a duas consequências distintas para as duas amostras de farinha.

Para a amostra SOR verificou-se uma interrupção do escoamento da amostra devido às alterações estruturais terem aumentado o valor de tensão de inércia para além da tensão aplicada de 50 Pa. Para a amostra AMA, para a qual a viscosidade máxima foi menor, a tensão aplicada foi suficiente para se atingir o limite físico do sistema, verificando-se uma diminuição contínua da viscosidade, após se atingir um pico de

viscosidade máxima, correspondendo a uma ruptura parcial da rede macromolecular tridimensional.

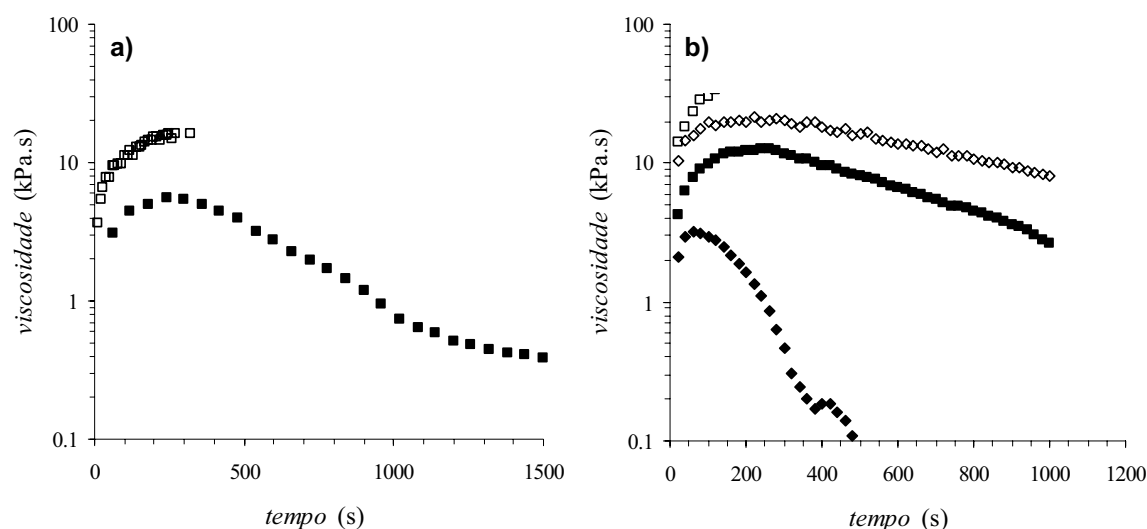


Figura 3.5 - Dependência temporal da viscosidade aparente de farinhas hidratadas (50% (m/m)) sujeitas a uma tensão de corte constante. a) - Farinhas AMA (■) e SOR (□) não deslipidificadas, tensão aplicada de 50 Pa (20°C). b) - Farinhas AMA (símbolos cheios) e SOR (símbolos abertos) deslipidificadas, tensão aplicada de 120 Pa (■, ●) e 150 Pa (□, ◇). Amostras preparadas pelo método 2.

O comportamento observado depende da tensão aplicada, como se ilustra na Figura 3.5b. As amostras de farinha SOR apresentam maior resistência à tensão aplicada, com maiores valores de viscosidade máxima. As amostras de farinhas deslipidificadas também mostraram menor sensibilidade à tensão aplicada e maiores valores de viscosidade máxima resultantes da estruturação imposta pela tensão aplicada.

A influência do método de preparação nas propriedades viscoelásticas das farinhas hidratadas é igualmente ilustrado na Figura 3.4. Os dois métodos de preparação diferem entre si no grau de desenvolvimento das massas de farinha. No método 1 (massa desenvolvida) considera-se que a amostra está hidratada e desenvolvida, i.e., considera-se que a amostra produzida constitui uma massa mais forte, desenvolvida por acção mecânica (mistura com a vareta). No método 2 (massa não desenvolvida), considera-se que a massa está hidratada mas que não foi desenvolvida por acção

mecânica. A preparação das amostras pelo método 2 tem como vantagem possibilitar o estudo do efeito da hidratação das amostras separadamente do efeito da mistura mecânica (método 1).

As amostras preparadas pelo método 2 apresentaram uma diminuição generalizada dos módulos viscoelásticos e um maior carácter viscoso (maior $\tan \delta$), especialmente a elevadas frequências. Porém, as amostras preparadas por este método apresentaram um perfil das curvas mecânicas (Figura 3.4a) semelhante ao das amostras preparadas pelo método 1, apresentando um perfil característico de sistemas estruturados com propriedades viscoelásticas. Um efeito semelhante foi verificado para as farinhas deslipidificadas. A diminuição dos módulos viscoelásticos de amostras de farinha preparadas por um método semelhante ao método 2 foi anteriormente referida por outros autores (Campos *et al.*, 1997; Schluentz *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001). Campos *et al.* (1997) observaram a diminuição dos módulos viscoelásticos quer para amostras de farinha de trigo duro, quer para amostras de farinha de trigo mole. Lee *et al.* (2001) complementaram os estudos com microscopia confocal de varrimento a laser, tendo referido que as amostras de massa desenvolvida apresentavam uma matriz proteica mais extensa e mais desenvolvida do que as amostras de massa não desenvolvida.

O processo de hidratação dos diversos ingredientes é o processo primário da transformação de uma farinha em massa. Devido ao seu carácter polar, a água é um elemento fundamental na mediação das interacções entre os vários componentes da farinha. A introdução de um processo de mistura e amassamento da massa irá aumentar o grau de contacto entre os ingredientes, potenciando as interacções entre si, transformando a mistura farinha/água numa massa com propriedades viscoelásticas diferentes do sistema antes do amassamento. A interacção entre as proteínas do glúten conduz à formação de uma rede sustentada por ligações dissulfeto (S-S) e por ligações de hidrogénio (Ewart, 1968; Lásztity, 1972; Eliasson e Larsson, 1993; Belton, 1999). Quanto maior for o grau de mistura, mais complexa e mais forte é a rede formada, fortalecendo assim a estrutura do glúten, e portanto, a estrutura da massa de farinha. Na preparação das amostras pelo método 2, nenhum trabalho mecânico é introduzido, pelo que a estrutura tridimensional complexa formada pelas proteínas do glúten não é tão forte e a massa apresenta menor estruturação (menor G^*).

O efeito da deslipidificação no comportamento viscoelástico das massas foi igualmente analisado e é exemplificado na Figura 3.6. A diminuição do teor de lípidos das farinhas, para valores da ordem dos 0,08 %, provocou alterações quantitativas no comportamento viscoelástico das massas, verificando-se um aumento dos módulos viscoelásticos. Efeito semelhante foi verificado para as massas preparadas pelo método 1.

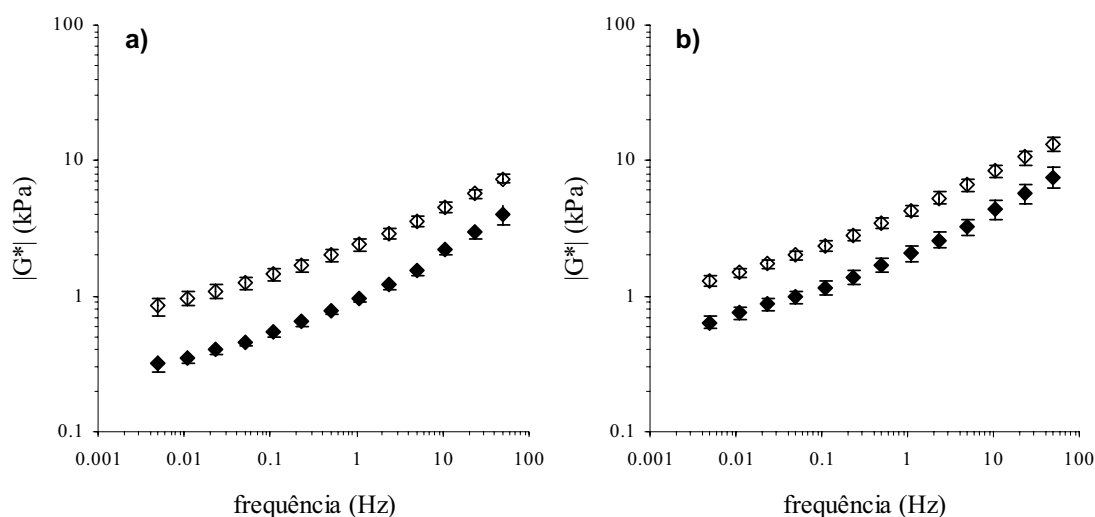


Figura 3.6 - Módulo complexo em função da frequência de oscilação para farinhas hidratadas (a- Amazonas, b- Sorraia), originais (○) e deslipidificadas (◇) (50% (m/m) de hidratação, $\gamma=0,05\%$, 20°C), preparadas de acordo com o método 2. Os resultados apresentados correspondem a curvas médias obtidas em três ensaios. As barras de erro apresentadas correspondem aos valores de desvio padrão obtidos.

III. 3.2.3. Efeito do Tratamento Térmico

O efeito do tratamento térmico no comportamento reológico das massas das farinhas AMA e SOR, foi estudado para as duas variedades de farinha, deslipidificadas ou não, e preparadas pelos dois métodos referidos anteriormente.

O comportamento geral observado é exemplificado na Figura 3.7. Os resultados são igualmente apresentados em termos da variação do módulo complexo ($|G^*|(\omega)$) e da tangente ao ângulo de perda ($\tan \delta=G''(\omega)/G'(\omega)$) com a temperatura. Inicialmente,

entre 20 e 50°C, verifica-se um ligeiro decréscimo do módulo G^* , como consequência esperada do enfraquecimento das interações intermoleculares entre os componentes do sistema. Na vizinhança dos 60°C, alterações drásticas e irreversíveis ocorrem no comportamento do sistema, traduzidas por um aumento abrupto do módulo G^* e uma diminuição drástica do valor de $\tan \delta$, significando um aumento acentuado da rigidez e do carácter elástico do sistema.

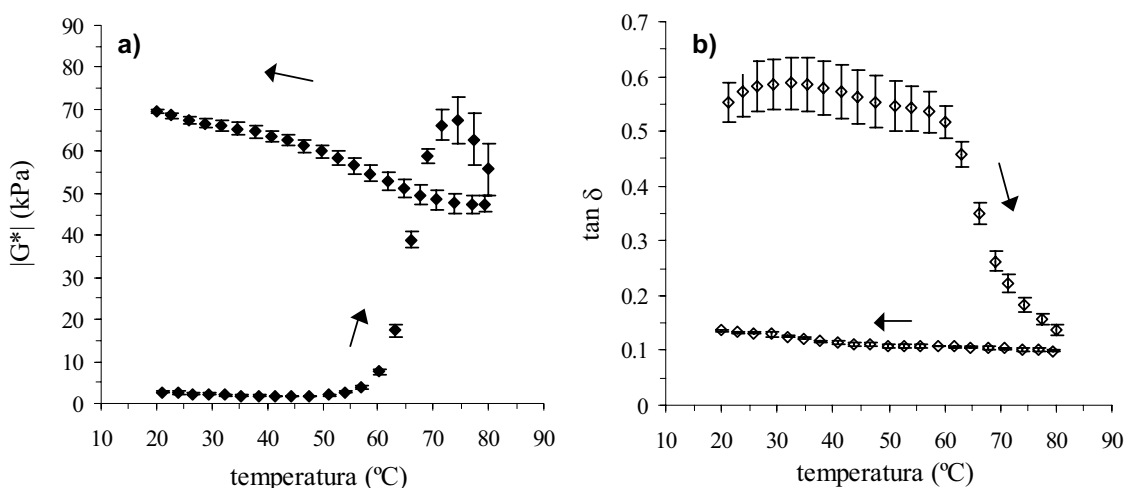


Figura 3.7 - Módulo complexo (a) e tangente ao ângulo de perda (b) em função da temperatura, para farinha SOR deslipidificada a 50% (m/m) de hidratação, preparada de acordo com o método 2 ($\gamma=0,05\%$, $\omega=0,5$ Hz, 20°C). A amostra foi sujeita “in situ” a aquecimento entre 20 e 80°C (2°C/min), mantida a esta temperatura durante 10 min, e depois arrefecida até 20°C (2°C/min). Os resultados apresentados correspondem a curvas médias obtidas em três ensaios. As barras de erro apresentadas correspondem aos valores de desvio padrão.

Após se atingir determinado valor máximo para G^* (ou G'), verifica-se uma diminuição do módulo tanto mais acentuada quanto maior a temperatura máxima atingida. Por arrefecimento, verifica-se um aumento do módulo como consequência da re-organização da rede macromolecular e do gel formado, mas sem ocorrer apreciável alteração do carácter elástico do sistema ($\tan \delta$ praticamente inalterada durante o arrefecimento).

Atendendo aos resultados obtidos para a influência da temperatura no comportamento viscoelástico do glúten (cap. IV) e do amido (cap. VI) extraídos destas farinhas, e considerando o comportamento descrito para outras amostras de glúten e de gluteninas e gliadinas isoladas ou em mistura (Dreese *et al.*, 1988a,b), a drástica alteração do comportamento reológico das farinhas com o aumento da temperatura ($T > 50^{\circ}\text{C}$) pode ser atribuída, essencialmente, à gelatinização do amido, embora ocorram também importantes alterações ao nível da matriz proteica, tal como a desnaturação das proteínas do glúten, para temperaturas superiores a 70°C .

Durante o tratamento térmico descrito, foram verificadas diferenças entre as farinhas SOR e AMA. Como ilustrado na Figura 3.8, a farinha AMA hidratada (50% (m/m)) apresentou uma temperatura, para a qual se verifica o rápido aumento do módulo durante o aquecimento, mais elevada e um valor de módulo máximo igualmente mais elevado. O arrefecimento levou a que ambas as amostras apresentassem propriedades finais muito semelhantes. É de referir que, como será discutido mais à frente (cap. VI), o amido da variedade AMA apresentou uma temperatura de gelatinização e um pico de módulo mais elevados do que a variedade SOR, o que está de acordo com o comportamento observado para as farinhas.

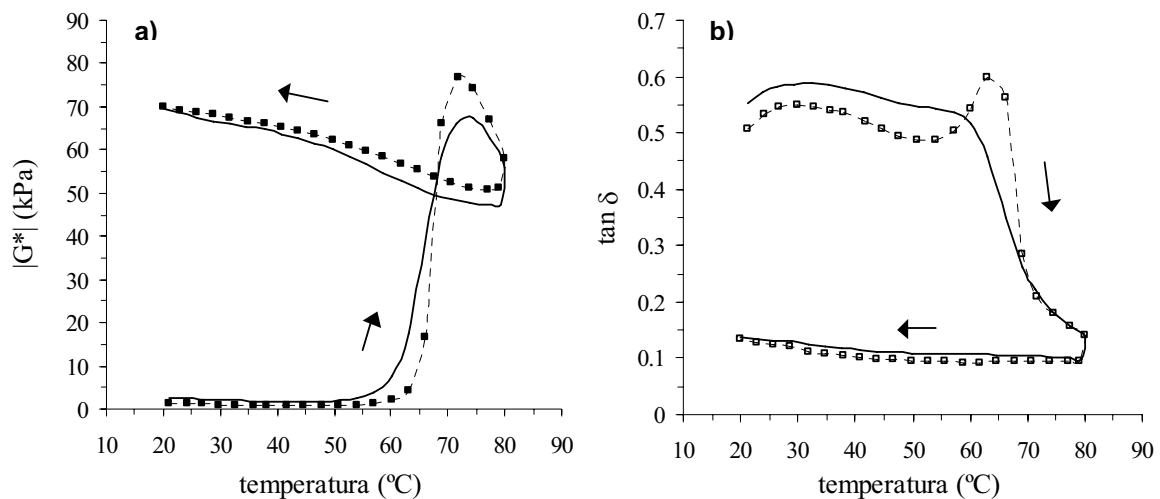


Figura 3.8 - Módulo complexo (a) e tangente ao ângulo de perda (b) em função da temperatura. Comparação entre farinha SOR (linha contínua, mesma amostra que na Fig. 3.7) e AMA (pontos em linha descontinua). Mesmo protocolo experimental usado para os resultados da Figura 3.7.

As diferentes temperaturas de gelatinização observadas entre as variedades poderão estar relacionadas com o diferente conteúdo de amido danificado. Tal como já referido anteriormente, a presença de amido danificado nas farinhas influencia a sua capacidade de absorção de água. Deste modo, uma farinha com uma maior percentagem de amido danificado, tal como a farinha SOR (Tabela 2.1, § II.3.1), apresentará uma maior capacidade de absorção de água. Ou seja, o amido é mais facilmente hidratado e, portanto, quando aquecido a elevadas temperaturas, o processo de gelatinização é mais facilitado. Uma farinha com menor capacidade de absorção de água, necessitará de temperaturas de gelatinização mais elevadas, tal como aconteceu com a farinha AMA.

O efeito dos dois métodos de preparação no comportamento térmico das amostras de farinha é ilustrado na Figura 3.9. Para o sistema mais estruturado (“massa desenvolvida”), obtido por utilização de acção mecânica durante a hidratação e mistura da farinha/água (método 1), verificou-se que a temperatura para a qual se verifica o rápido aumento do módulo é menor, o módulo máximo é mais elevado e a temperatura à qual ocorre este pico é menor do que para o sistema farinha/água preparado pelo método 2. Diferenças semelhantes foram obtidas para a variedade AMA e para farinhas com maior ou menor teor de lípidos. Para temperaturas superiores a 75°C e durante o arrefecimento o comportamento das farinhas preparadas pelos dois métodos é muito semelhante.

As amostras preparadas pelo método 2 necessitaram de temperaturas mais elevadas para que alguma alteração ocorresse no sistema, nomeadamente a gelatinização do amido. Uma possível explicação para este facto poderá ser a maior disponibilidade de espaço em redor dos grânulos de amido quando as amostras são preparadas pelo método 2. Ou seja, com o aumento da temperatura, os grânulos de amido aumentam consideravelmente de volume por absorção de água. Se os grânulos de amido estiverem muito próximos uns dos outros, eles irão exercer uma maior tensão entre si de modo a que se possam “encaixar” no espaço disponível, seja na solução aquosa, seja no interior da matriz proteica. Quando as amostras são preparadas pelo método 2, a rede de glúten formada é mais fraca (Lee *et al.*, 2001) e os grânulos de amido estão dispostos mais livremente no sistema. Quando as amostras são preparadas pelo método 1, para além de haver uma maior incorporação de grânulos de amido na

matriz proteica, esta apresenta um maior grau de desenvolvimento, i.e. a rede glúten formada é mais forte e apresenta uma maior resistência ao efeito do intumescimento dos grânulos de amido. Deste modo, o espaço disponível para os grânulos aumentarem livremente de volume é menor, pelo que se observa uma maior e mais rápida interação quer entre os grânulos de amido, quer entre estes e a matriz proteica.

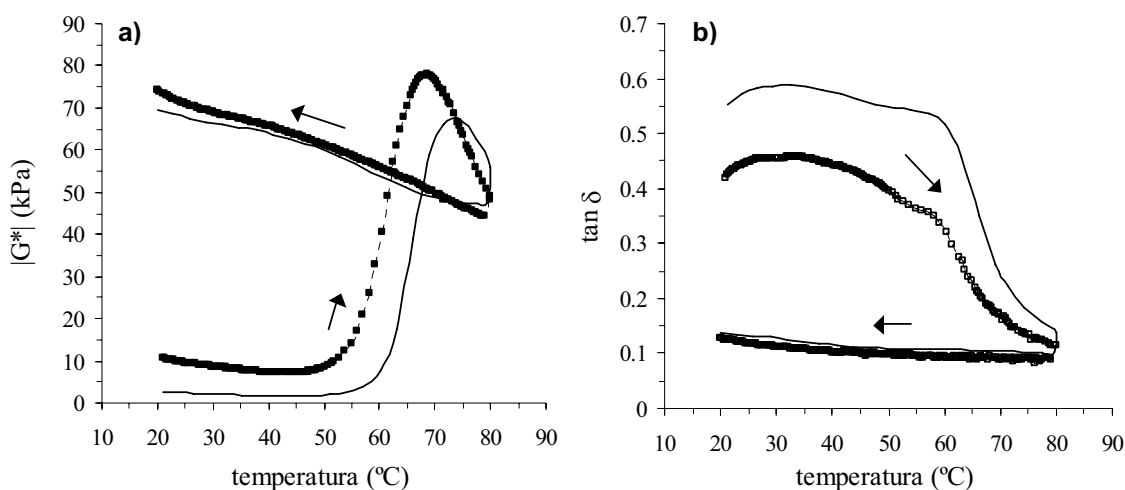


Figura 3.9 - Módulo complexo (a) e tangente ao ângulo de perda (b) em função da temperatura. Comparação entre farinhas SOR deslipidificadas preparadas pelo método 2 (massa não desenvolvida, linha contínua, mesma amostra que na Fig. 3.7) e pelo método 1 (massa desenvolvida, pontos em linha descontínua). Mesmo protocolo experimental usado para os resultados da Figura 3.7.

Assim, para as amostras preparadas pelo método 1, o processo de gelatinização do amido começa mais cedo, ou pelo menos, o reflexo da gelatinização no aumento da rigidez do sistema verifica-se mais cedo, pelo que as temperaturas de gelatinização, para estas amostras, são mais baixas do que para as amostras preparadas pelo método 2. Outros autores descreveram comportamentos reológicos semelhantes de amostras de farinha sujeitas a tratamentos térmicos (Hibberd e Wallace, 1966; Dreese *et al.*, 1988a; Campos *et al.*, 1997). Ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, Campos *et al.* (1997), registaram temperaturas de gelatinização mais baixas para amostras preparadas pelo método de massa não desenvolvida (método 2) do que para amostras preparadas pelo farinógrafo (método semelhante ao método 1 - “massa desenvolvida”).

O efeito da diminuição do teor de lípidos é ilustrado na Figura 3.10. Para as farinhas com maior teor de lípidos verificou-se que a temperatura correspondente à rápida subida dos valores dos módulos viscoelásticos durante o aquecimento foi mais elevada, e que o módulo correspondente ao pico máximo atingido foi menor (Figura 3.10a). Para além de um valor de $\tan \delta$ inicial ligeiramente mais elevado, não se verificaram diferenças apreciáveis neste parâmetro devido à remoção dos lípidos (Fig. 3.10B).

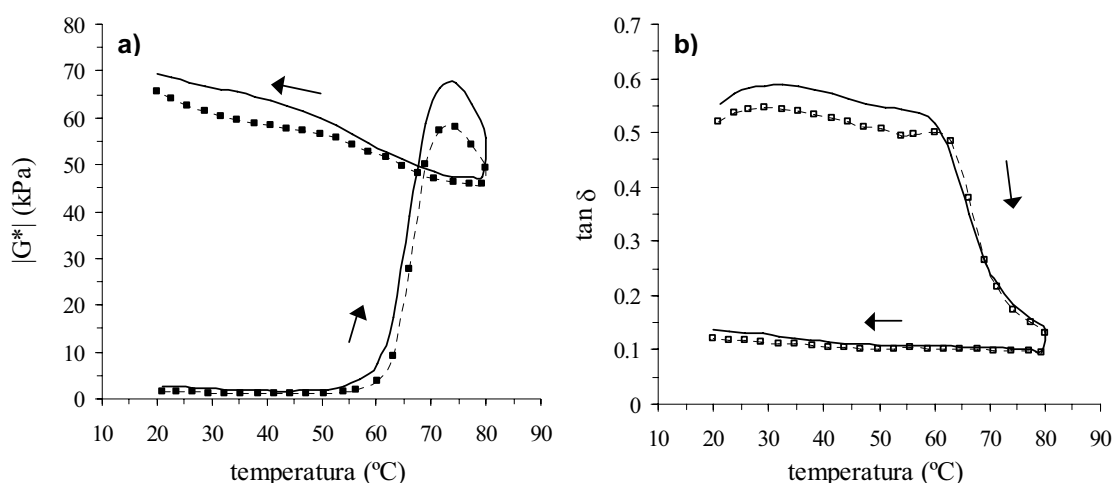


Figura 3.10 - Módulo complexo (a) e tangente ao ângulo de perda (b) em função da temperatura. Comparação entre farinha SOR deslipidificada (linha contínua, mesma amostra que na Fig. 3.7) e SOR original (pontos em linha descontínua). Mesmo protocolo experimental usado para os resultados da Figura 3.7.

Considerando que a extracção de lípidos diminui a barreira à absorção de água por parte dos grânulos de amido, o aumento da temperatura de gelatinização com o aumento do teor de lípidos pode ser associado a uma maior dificuldade para a passagem da água para o interior dos grânulos, atrasando, assim, todo o processo de intumescimento dos grânulos e, consequentemente, o processo de gelatinização.

III. 3.2.4. Comportamento viscoelástico após o ciclo de aquecimento-arrefecimento

Após arrefecimento até 20°C, realizaram-se varrimentos em frequência de oscilação para analisar o comportamento viscoelástico das amostras. A Figura 3.11 apresenta os

espectros mecânicos obtidos para amostras farinha/água preparadas pelo método 2 (“massas não desenvolvidas”).

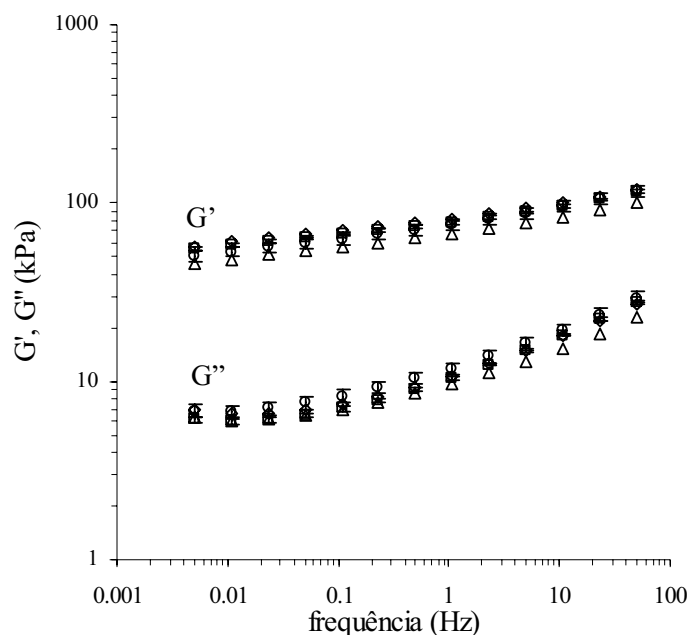


Figura 3.11 - Dependência dos módulos viscoelásticos G' e G'' face à frequência de oscilação (espectros mecânicos, $\gamma=0,05\%$, 20°C) para farinhas hidratadas, deslipidificadas (SL) ou não (CL), preparadas de acordo com o método 2 (“massas não desenvolvidas”) e ensaiadas após tratamento térmico 20°C - 80°C (10 min) -20°C , $2^\circ\text{C}/\text{min}$. (\diamond) AMA CL, (\square) AMA SL, (\triangle) SOR CL, (\circ) SOR SL. Os resultados apresentados correspondem a curvas médias obtidas em três ensaios. Apresentam-se algumas barras de erro, correspondentes aos valores de desvio padrão obtidos.

O comportamento viscoelástico é semelhante quer para as farinhas AMA e SOR quer para amostras com diferente teor de lípidos. Relativamente às amostras não aquecidas (ver p.ex. Fig. 3.3B), estas amostras apresentaram módulos viscoelásticos mais elevados, com menor dependência face à frequência e com maior diferença entre eles (menor $\tan \delta$), sinónimo de sistemas mais estruturados, com menor teor de componentes a contribuir para a dissipação de energia associada a cada solicitação, com maior “perfeição” nas interacções intermoleculares que dão origem à rede tridimensional macromolecular, onde a mobilidade é mais reduzida. Após o aquecimento do sistema, o produto final formado é um gel de amido incorporado numa matriz proteica desnaturada. À medida que o gel de amido arrefece e com o tempo, as cadeias de amido tornam-se menos móveis, as interacções entre as cadeias

de amilose tornam-se mais fortes e o gel fica mais rígido e opaco, aumentando, assim, os valores dos módulos viscoelásticos. Este fenómeno de endurecimento do gel de amido é conhecido por retrogradação do amido e é considerado como sendo o principal responsável pelo envelhecimento do pão.

Resultado interessante diz respeito às diferenças observadas entre as duas variedades, AMA e SOR, quando as amostras foram preparadas pelo método 1 (“massas desenvolvidas”). Neste caso, após o tratamento térmico, a variedade AMA apresentou um módulo de conservação mais elevado, módulo de perdas semelhante, ou seja, um carácter elástico claramente mais acentuado do que as amostras da variedade SOR (Figura 3.12).

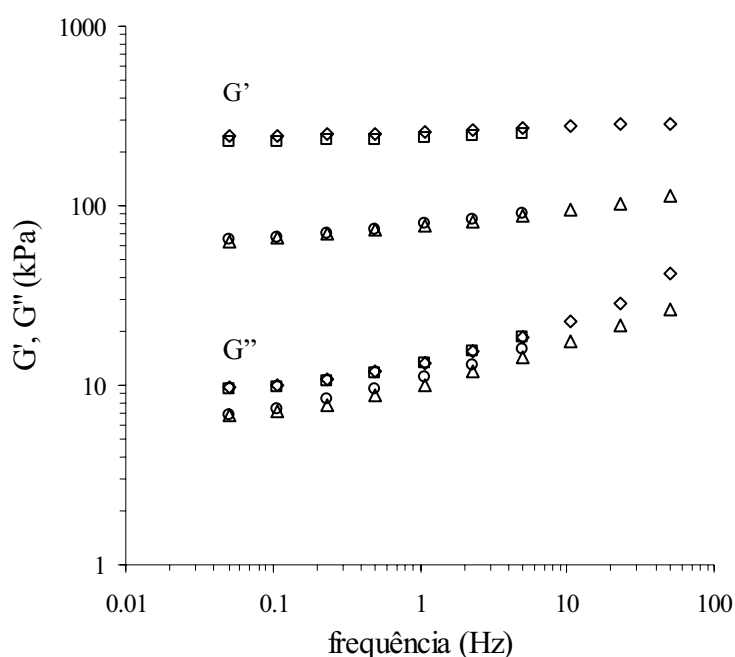


Figura 3.12 - Dependência dos módulos viscoelásticos G' e G'' face à frequência de oscilação (espectros mecânicos, $\gamma=0,05\%$, 20°C) para farinhas hidratadas, deslipidificadas (SL) ou não (CL), preparadas de acordo com o método 1 (“massas desenvolvidas”) e ensaiadas após tratamento térmico 20°C - 80°C (10 min) - 20°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$. (◇) AMA CL, (□) AMA SL, (△) SOR CL, (○) SOR SL.

III. 3.3. Caracterização das farinhas de trigo por RMN do estado sólido

Na caracterização das farinhas de trigo das variedades AMA e SOR por espectroscopia de RMN do estado sólido, efectuaram-se estudos de RMN de ^1H e ^{13}C em amostras de farinha no estado seco (0% D_2O) e no estado hidratado (50% D_2O m/m). As amostras de farinha foram hidratadas de acordo com dois métodos de preparação diferentes, o método de massa desenvolvida (método 1) e o método de massa não desenvolvida (método 2), tal como descrito em § III.2.2. Nesta secção apresenta-se o estudo do efeito do método de preparação das amostras e da hidratação, através da análise dos espectros de RMN de ^{13}C e de ^1H adquiridos à temperatura ambiente (20°C). O estudo do efeito do tratamento térmico nas amostras de farinha foi também efectuado através da comparação dos espectros de RMN de ^{13}C adquiridos antes e depois do tratamento térmico, e dos espectros de RMN de ^1H adquiridos a várias temperaturas na gama de 20-80-20°C.

III. 3.3.1. Caracterização por espectroscopia de RMN de ^{13}C

III. 3.3.1.1. Efeito do método de preparação

O efeito do método de preparação das amostras foi primeiramente analisado no sentido de avaliar diferenças entre amostras preparadas pelos dois métodos diferentes: o método de massa desenvolvida (método 1) e o método de massa não-desenvolvida (método 2). Para tal, foram adquiridos espectros de ^{13}C -CP/MAS (Figura 3.13) e ^{13}C -SPE (Figura 3.14) para as amostras de farinha da variedade SOR, hidratadas a 50% D_2O (m/m) pelos métodos 1 e 2.

Os diferentes métodos de preparação parecem ter produzido um efeito semelhante quer entre os espectros de ^{13}C -CP/MAS, quer entre os espectros de ^{13}C -SPE. As amostras preparadas pelos dois métodos apresentaram espectros de ^{13}C com perfis bastante semelhantes, apresentando os mesmos sinais derivados da contribuição de amido, proteínas e lípidos. A análise detalhada dos espectros de ^{13}C é apresentada na secção seguinte (§ III.3.3.2). Dada a semelhança verificada para os espectros de ^{13}C das amostras preparadas pelos dois métodos, apenas um deles (o método 2) foi

utilizado para o estudo dos efeitos da hidratação e do tratamento térmico, a seguir apresentados.

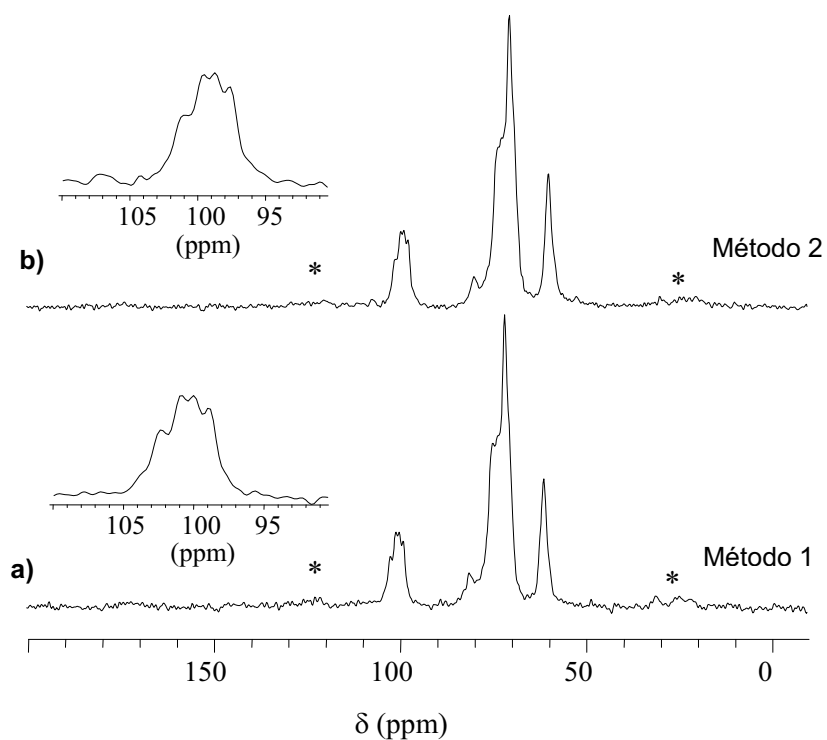


Figura 3.13 - Espectros de RMN de ^{13}C -CP/MAS da farinha Sorraia deslipidificada hidratada (50% D_2O m/m) a)- pelo método 1, ns= 500, LB=20; b)- pelo método 2, ns=500, LB=20; SR= 5kHz; * - bandas laterais de rotação; os inserts apresentam a expansão da região 110-90 ppm respectivamente para cada espectro

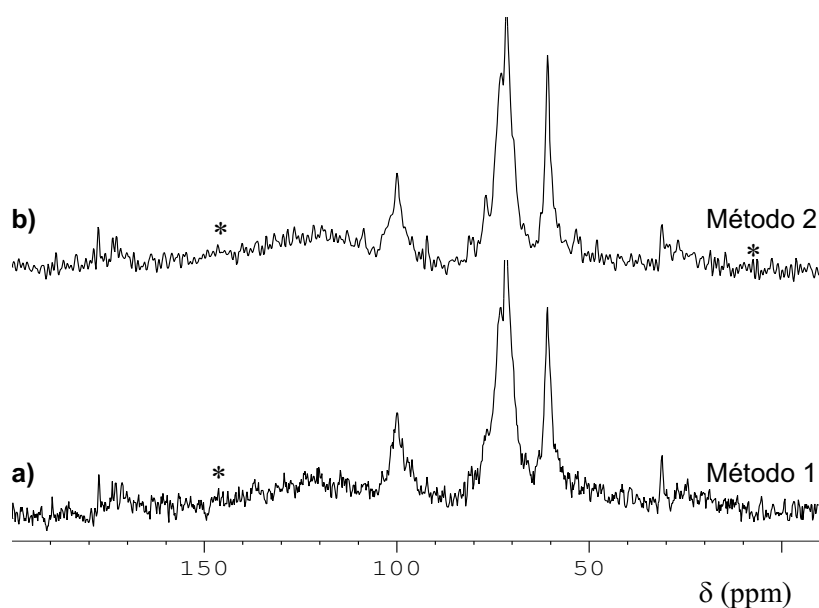


Figura 3.14 - Espectros de RMN de ^{13}C -SPE da farinha Sorraia deslipidificada hidratada (50% D_2O m/m) a)- pelo método 1, ns= 500, LB=20; b)- pelo método 2, ns=500, SR= 5kHz; * - bandas laterais de rotação

III. 3.3.1.2. Efeito da hidratação

O efeito da hidratação das amostras ao nível dos espectros de RMN de ^{13}C foi analisado através da aquisição de espectros ^{13}C -CP/MAS de amostras de farinhas secas e hidratadas pelo método 2 (método de massa não desenvolvida). A Figura 3.15 apresenta os espectros de ^{13}C -CP/MAS das amostras de farinha da variedade AMA no estado seco e no estado hidratado (50% D_2O m/m). O efeito observado devido à hidratação foi semelhante para as farinhas de ambas as variedades, pelo que nesta secção apenas se apresentam os resultados para uma das variedades (farinha AMA). Na Figura 3.15c é também apresentado o espectro de ^{13}C -CP/MAS da farinha da variedade AMA com lípidos (50% D_2O m/m), possibilitando assim a comparação do efeito da hidratação na amostra de farinha deslipidificada e na amostra de farinha original (com lípidos). Os principais sinais estão numerados, e as respectivas atribuições estão indicadas na Tabela 3.2 As atribuições foram baseadas em trabalhos

publicados anteriormente (Morrison *et al.*, 1993c; Morgan *et al.*, 1995; Larsson, 1997; Alberti, 2000).

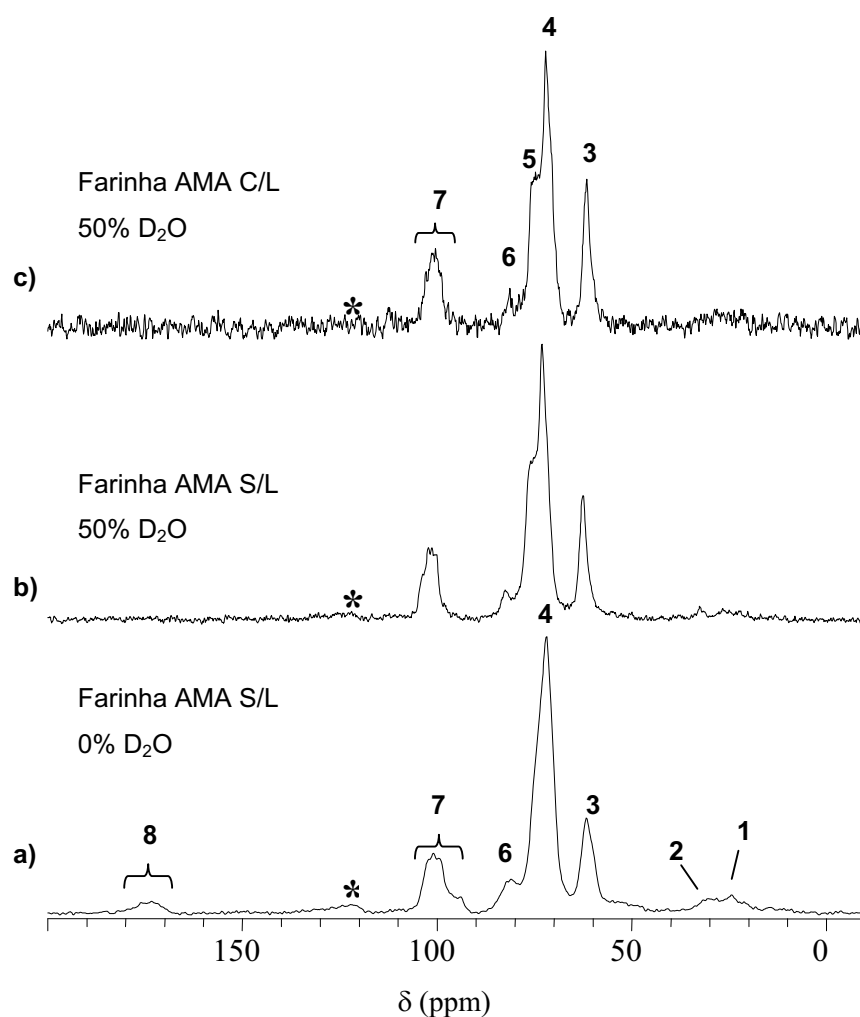


Figura 3.15 - Espectros de RMN de ^{13}C -CP/MAS da farinha Amazonas (AMA), SR= 5kHz, a)-amostra deslipidificada (S/L) seca, ns= 500, LB=20; b)- amostra deslipidificada (S/L) hidratada (50% D_2O m/m) pelo método 2, ns=500, LB=20; c)- amostra original (C/L) hidratada (50% D_2O m/m) pelo método 2, ns= 99, LB=20; *- bandas laterais de rotação

O espectro de ^{13}C -CP/MAS da amostra de farinha seca (Figura 3.15a) reflecte essencialmente o componente mais abundante das farinhas, o amido, com os sinais a 62-63 ppm (pico 3), 72-73 ppm (pico 4) e 98-103 ppm (pico 7), correspondentes aos carbonos C6, C2-C5 e C1, respectivamente. Neste espectro observa-se ainda a presença de sinais a cerca de 24-31 ppm (picos 1 e 2) e a 173-176 ppm (pico 8), derivados das proteínas do glúten e lípidos. Os picos 1 e 2 são atribuídos à

ressonância dos carbonos alifáticos (-CH₂-) da maioria dos aminoácidos constituintes da matriz proteica e das cadeias hidrocarbonadas dos lípidos. O pico 8 é atribuído à ressonância dos carbonos dos grupos carbonilo (-C=O) das cadeias laterais de aminoácidos constituintes do glúten, tais como a glutamina e a asparagina, bem como dos ácidos gordos constituintes dos lípidos.

Tabela 3.2. Atribuições para os principais sinais dos espectros ¹³C-CP/MAS da farinha Amazonas, com base em trabalhos publicados por Morrison *et al.* (1993c), Morgan *et al.* (1995), Larsson (1997) e Alberti (2000).

Pico nº	δ / ppm	Atribuição	Grupo funcional
1	24.1	Proteína + Lípidos	-(CH ₂) _n -, -CH ₃
2	30.9		-(CH ₂) _n -, -CH ₃
3	61.3	Amido - C6 -	-CH ₂ OH
4	71.8	Amido - C2-C5 -	-CHOH-
5	74.6	Amido - C2-C5 -	-CHOH-
6	82.1	Amido - C4 -	-CHOH-
7	99.7-103.6	Amido - C1 -	-CHO
8	173.5-175.9	Proteína + Lípidos	- C=O

A hidratação das amostras de farinha provocou algumas alterações nos espectros de ¹³C-CP/MAS (Figura 3.15b-c), reflectindo uma alteração na dinâmica e na organização molecular das amostras de farinha como resultado do efeito da plasticização da água. Em ambas as amostras de farinha com e sem lípidos, a hidratação conduziu a um aumento da resolução de todos os sinais o que sugere uma diminuição da anisotropia na amostra. A cerca de 75 ppm (pico 5) surgiu um outro

sinal parcialmente resolvido (em forma de ombro), atribuído à ressonância do carbono C-3, um sinal característico da conformação V do amido (Horii *et al.*, 1987). Estando o aparecimento deste sinal relacionado com a adição de água ao sistema, e estando a conformação V associada à conformação helicoidal simples das cadeias de amilose, este resultado parece mostrar que a hidratação do amido induz a uma conformação em hélice das cadeias de amilose, tal como já anteriormente reportado por outros autores (Marchant e Blanshard, 1978; Lund, 1988). Com a hidratação, os sinais a 24.1-30.9 ppm e a 173.5-175.9 ppm diminuíram bastante de intensidade, tornando-se quase imperceptíveis dada a razão sinal/ruído. A diminuição da intensidade destes sinais indica um aumento significativo de mobilidade dos componentes proteicos e lipídicos por efeito da hidratação.

Ao contrário dos outros carbonos, o carbono C-1 (pico 7) apresenta um sinal com uma configuração algo diferente relativamente aos outros sinais e um comportamento diferente após a hidratação. A Figura 3.16 apresenta a expansão do pico do C-1 para as amostras de farinha apresentadas na Figura 3.15. Por observação da Figura 3.16, verifica-se que, para as três amostras analisadas, o carbono C-1 apresentou uma multiplicidade de picos, tendo a forma do sinal, o número de picos e a sua posição no desvio químico variado entre os três espectros. De acordo com Veregin *et al.* (1986), o tipo configuração do sinal do carbono C1 é uma indicação do tipo de conformação (A, B ou V) apresentada pelo amido.

Para a amostra de farinha seca (Figura 3.16a) verifica-se que o sinal do carbono C1 apresentou um conjunto de três picos a cerca de 102 ppm, 101 ppm e 100 ppm. O aparecimento destes sinais três sinais com este desvio químico sugere que o amido, no estado seco, apresenta uma conformação não helicoidal, ou seja, conformação do tipo A (Veregin *et al.*, 1986). A hidratação do sistema originou uma alteração da configuração da banda do carbono C1, tal como se pode verificar na Figura 3.16b-c.

Das principais alterações destaca-se o aparecimento do sinal a cerca de 103 ppm que aparece sob a forma de um ombro no espectro da amostra de farinha deslipidificada (Figura 3.16b), e sob a forma de um pico definido no espectro da amostra de farinha original (Figura 3.16c). O aparecimento deste sinal está relacionado com o tipo de conformação em V do amido, o que sublinha mais uma vez a predominância de uma configuração helicoidal derivada da hidratação das cadeias de amilose do amido.

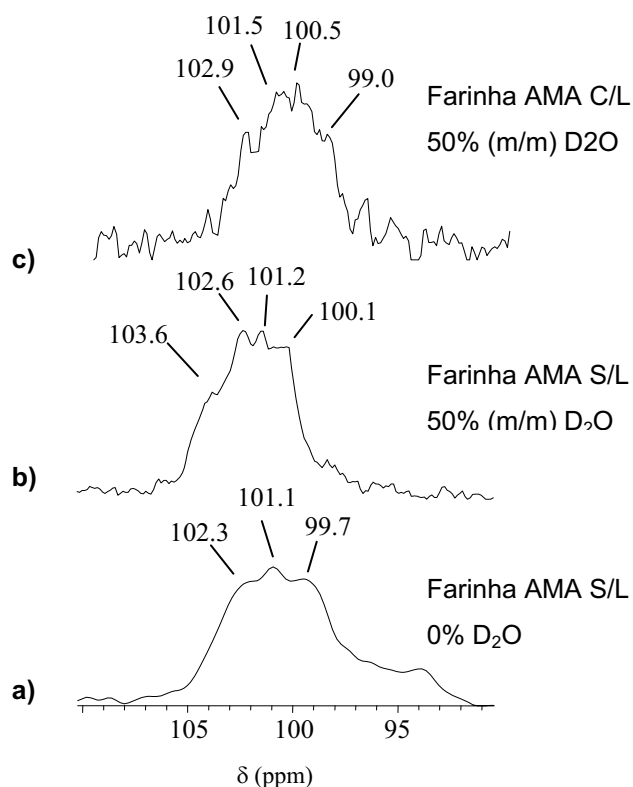


Figura 3.16 - Expansão da região 110-90 ppm dos espectros ^{13}C -CP/MAS da farinha AMA da Figura 3.15 mostrando o pormenor do sinal do carbono C1.

Nas amostras de farinha, os componentes mais móveis tais como os lípidos dificilmente são detectados por espectroscopia de ^{13}C -CPMAS, já que esta técnica selecciona essencialmente os carbonos mais rígidos. A detecção de espécies mais móveis por espectroscopia de ^{13}C requer o uso de experiências complementares, tais como a espectroscopia de ^{13}C -SPE. A experiência de ^{13}C -SPE selecciona os carbonos mais móveis (com menores valores de T_{1H}) ou seja, aqueles cujo tempo de relaxação é inferior ao tempo de intervalo entre scans (recycle time). Ou seja, sempre que um núcleo é excitado por uma radiação de frequência adequada (um scan), ele demora um certo tempo a regressar (ou relaxar) ao seu estado inicial. Se o tempo de intervalo entre scans for inferior ao tempo de relaxação, os núcleos excitados não terão tempo de regressar ao estado fundamental, pelo que nenhum sinal é observado no espectro de ^{13}C -SPE. Numa amostra, núcleos localizados em partes diferentes experimentam tempos de relaxação diferentes. Os componentes mais móveis apresentam tempos de relaxação muito curtos, e os componentes mais rígidos apresentam tempos de relaxação muito longos (ver Figura 1.24, § I.2.2.3). Assim, se os espectros de SPE

forem adquiridos com um tempo de “recycle” suficientemente curto ($<5T_1$), eles podem ser usados para seleccionar e identificar núcleos nos sistemas cujos carbonos possuem tempos de relaxação curtos.

Assim, no sentido de melhor comparar as farinhas hidratadas com e sem lípidos, o estudo por espectroscopia de RMN de ^{13}C foi complementado pela aquisição de espectros de ^{13}C -SPE, com 5s de intervalo entre scans, para as amostras de farinha AMA hidratadas (50% D_2O) com e sem lípidos, os quais estão apresentados na Figura 3.17. Amostras secas apresentam tempos de relaxação muito longos, pelo que a experiência de ^{13}C -SPE se tornaria muito morosa de modo a se conseguir alguma informação e, portanto, não foi usada para a análise das farinhas no estado seco.

Por observação da Figura 3.17 verifica-se que os espectros de ^{13}C -SPE de ambas as amostras apresentaram essencialmente os mesmos sinais que os espectros de ^{13}C -CP/MAS, observando-se no entanto a sobreposição de todo o espectro sobre um componente mais largo proveniente da sonda. Os espectros de ^{13}C -SPE apresentaram sinais bastante resolvidos, indicativos da elevada mobilidade dos carbonos correspondentes. Por observação destes espectros, verifica-se que os picos mais intensos são os correspondentes aos carbonos C6 e C2-C5, o que significa que alguns dos anéis de amido apresentam uma maior mobilidade relativamente ao carbono C1. Espectros de ^{13}C -SPE semelhantes aos apresentados neste trabalho foram também obtidos por outros autores, para diversas variedades de amido (Morgan *et al.*, 1995). Os espectros mostram ainda a presença de ressonâncias nas regiões de 20-30 ppm (carbonos alifáticos), 128-130 ppm (carbonos $\text{C}=\text{C}$) e a 170-178 ppm (carbonos $\text{C}=\text{O}$) revelando a contribuição dos lípidos. Seria de esperar que o espectro de ^{13}C -SPE da amostra de farinha AMA original (com lípidos) apresentasse uma maior evidência da presença de lípidos, comparativamente à amostra de farinha AMA deslipidificada. Porém, não foram encontradas diferenças significativas nos espectros de ^{13}C -SPE de ambas as amostras, tendo estes apresentado perfis bastante semelhantes.

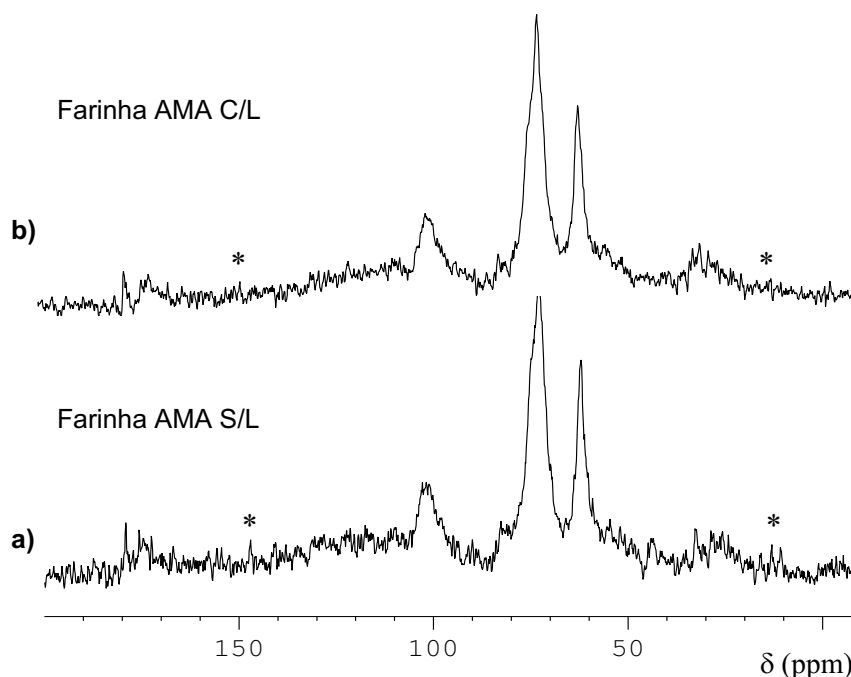


Figura 3.17 - Espectros de RMN de ^{13}C -SPE da farinha Amazonas, SR= 5kHz, a)- amostra deslipidificada (S/L) hidratada (50% D_2O m/m) pelo método 2, ns= 500, LB=20; b)- amostra com lípidos (C/L) hidratada (50% D_2O m/m) pelo método 2, ns= 99, LB=20; *- bandas laterais de rotação

III. 3.3.1.3. Efeito do tratamento térmico 20-80-20°C

Para o estudo do efeito do aquecimento (20-80°C) e posterior arrefecimento (80-20°C), adquiriram-se espectros de ^{13}C -CP/MAS e ^{13}C -SPE a 20°C, antes e depois do tratamento térmico.

As Figuras 3.18 e 3.19 apresentam, respectivamente, os espectros de ^{13}C -CP/MAS e ^{13}C -SPE, adquiridos antes e depois do ciclo de aquecimento/arrefecimento, para a amostra de farinha SOR preparada pelo método 2. Para simplificação dos resultados, apenas se apresentam os espectros referentes à farinha da variedade SOR, e apenas para as amostras preparadas pelo método 2, uma vez que não se encontraram diferenças significativas nos resultados quer entre as variedades, quer entre métodos de preparação. Nas Figuras 3.18 e 3.19 estão incluídos insertos que apresentam, numa escala amplificada, o pormenor dos sinais correspondentes às ressonâncias dos carbonos C1 dos anéis de glucose do amido.

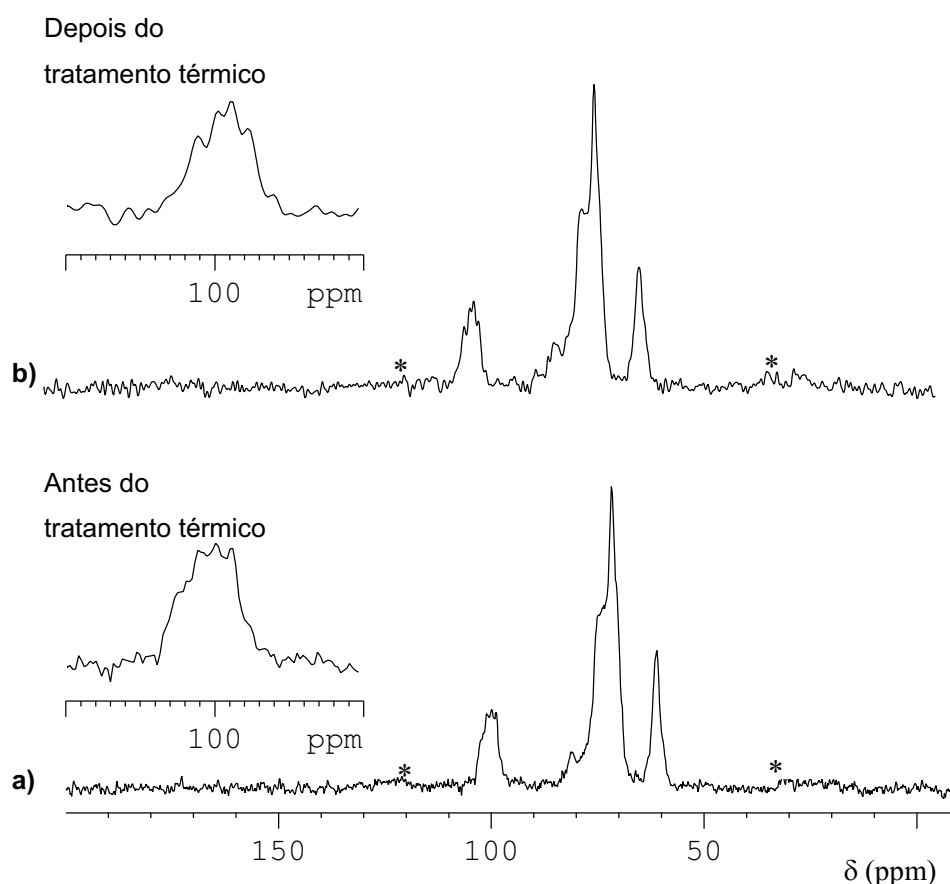


Figura 3.18 - Efeito do tratamento térmico 20-80-20°C nos espectros de RMN de ^{13}C -CP/MAS da farinha Sorraia deslipidificada, hidratada a 50% D_2O (m/m) pelo método 2, SR=5kHz, a)- antes tratamento térmico, ns=500, LB=20; b)- após tratamento térmico, ns=500, LB=20; os inserts apresentam a expansão da região 110-90 ppm respectivamente para cada espectro

Por observação da Figura 3.18b, verifica-se que após o ciclo de aquecimento/arrefecimento, a razão sinal/ruído (S/N) aumentou nos espectros de ^{13}C -CP/MAS (S/N antes do tratamento térmico=74; S/N depois tratamento térmico=85), o que indica um aumento da rigidez no sistema em geral, o qual deverá estar relacionado com o processo de retrogradação do amido.

Como resultado do tratamento térmico sofrido pelas amostras, verificou-se uma alteração na forma do sinal do carbono C1 (98-103 ppm - ver inserts), o que sugere uma alteração da conformação das cadeias de amido e do ambiente em torno do C1.

Após o tratamento térmico verifica-se uma melhoria da resolução deste sinal, o que é traduzido por um estreitamento da largura de banda a meia altura de 473 Hz (antes do tratamento térmico) para 453 Hz (depois do tratamento térmico). A diminuição da largura de banda deste sinal e, portanto, a melhoria da resolução, parece indicar uma maior organização molecular em torno dos carbonos C1.

O sinal dos carbonos C2-C5 manteve a largura de banda (551 Hz), observando-se no entanto uma melhor definição do sinal a 74 ppm. O sinal do carbono C6 (59,6 ppm), apresentou um comportamento diferente do carbono C1, observando-se um alargamento da largura de banda de 236 Hz (antes do tratamento térmico) para 276 Hz (depois do tratamento térmico), indicativo de maior anisotropia.

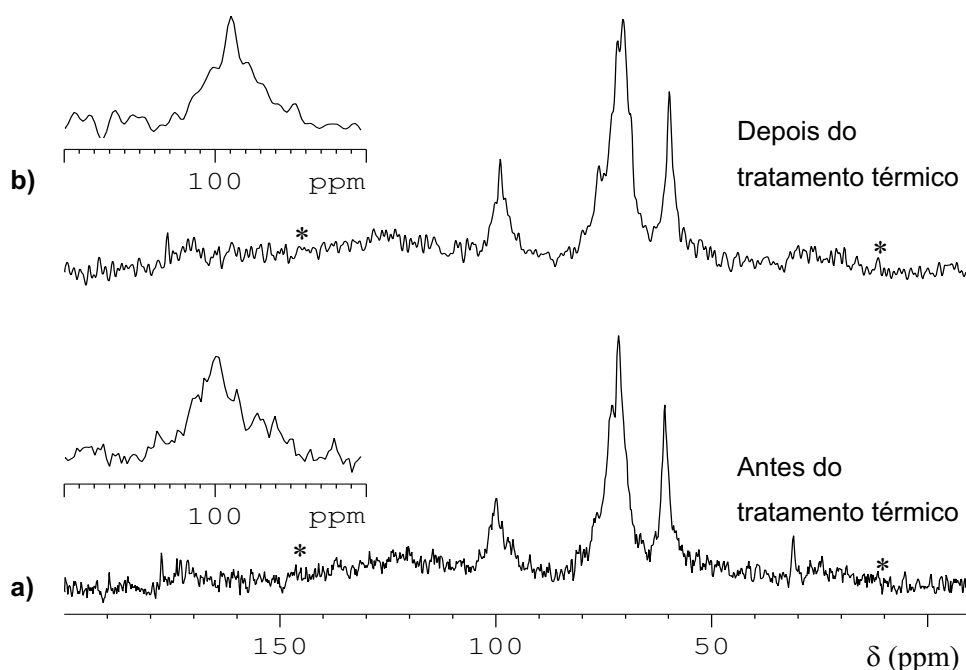


Figura 3.19 - Efeito do tratamento térmico 20-80-20°C nos espectros de RMN de ^{13}C -SPE da farinha Sorraia deslipidificada, hidratada a 50% D_2O (m/m) pelo método 2, SR= 5kHz, a)- antes tratamento térmico, ns=500, LB=20; b)- após tratamento térmico, ns=500, LB=20; os insertos apresentam a expansão da região 110-90 ppm respectivamente para cada espectro

Por observação da Figura 3.19 verifica-se que o espectro de ^{13}C -SPE registado após o tratamento térmico (20-80-20°C) apresentou os mesmos sinais observados no espectro registado antes do aquecimento, indicando a presença de componentes móveis na

amostra, sobretudo amido e lípidos residuais. No entanto, observa-se que uma alteração do perfil do sinal dos carbonos C2-C5 (70-75 ppm) o que parece indicar que, após o tratamento térmico, a conformação média dos anéis de glucose terá sido alterada relativamente àquela anterior ao aquecimento. Para o carbono C1 é também observada uma alteração da forma e melhoria da resolução do sinal (ver insertos) sugerindo a alteração da conformação em torno da ligação glicosídica e maior mobilidade.

III. 3.3.2. Caracterização por espectroscopia RMN de ^1H

III. 3.3.2.1. Caracterização no estado seco

Na caracterização das duas variedades de farinha de trigo por RMN de ^1H , as amostras de farinha foram primeiramente analisadas no estado seco, de modo a possibilitar a detecção das espécies mais móveis previamente à hidratação. A Figura 3.20 apresenta os espectros adquiridos a 0 kHz e a 5 kHz para a farinha da variedade AMA no estado seco (0% D_2O). O comportamento observado foi semelhante para ambas as variedades pelo que, por uma questão de simplificação de resultados, apenas se apresentam os resultados para uma das variedades (farinha AMA).

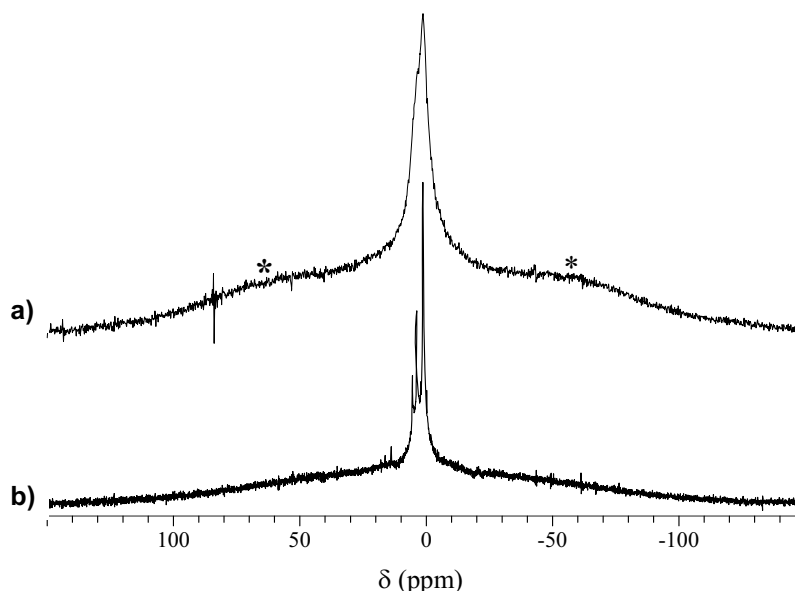


Figura 3.20 - Efeito da velocidade de rotação nos espectros de ^1H -MAS de amostras de farinha da variedade AMA no estado seco - a) 0 kHz, ns=32 ; b) 5 kHz, ns=32; * - bandas laterais de rotação

O espectro adquirido nas condições estáticas (Figura 3.20a) apresenta um pico largo centrado a 1,1 ppm derivado da contribuição de componentes mais móveis, sobreposto sobre uma banda mais larga derivada da contribuição de componentes do sistema mais imobilizados. Este espectro reflecte ainda a ocorrência de interacções anisotrópicas indicadas pelo aparecimento de bandas laterais muito largas, indicadas na figura com o símbolo *. A rotação da amostra no estado seco a uma velocidade de rotação mais elevada (Figura 3.20b) conduziu a um estreitamento do sinal e à redução da anisotropia anteriormente observada. A banda do componente mais estreito apresenta agora um maior número de sinais relativamente resolvidos.

Apesar do efeito da velocidade de rotação ter sido semelhante entre as duas variedades, o perfil dos espectros de protão das amostras secas rodadas a 5 kHz foi ligeiramente diferente entre as duas variedades. A Figura 3.21 apresenta os espectros de RMN de ^1H -MAS a 5kHz das amostras secas das farinhas AMA e SOR previamente deslipidificadas.

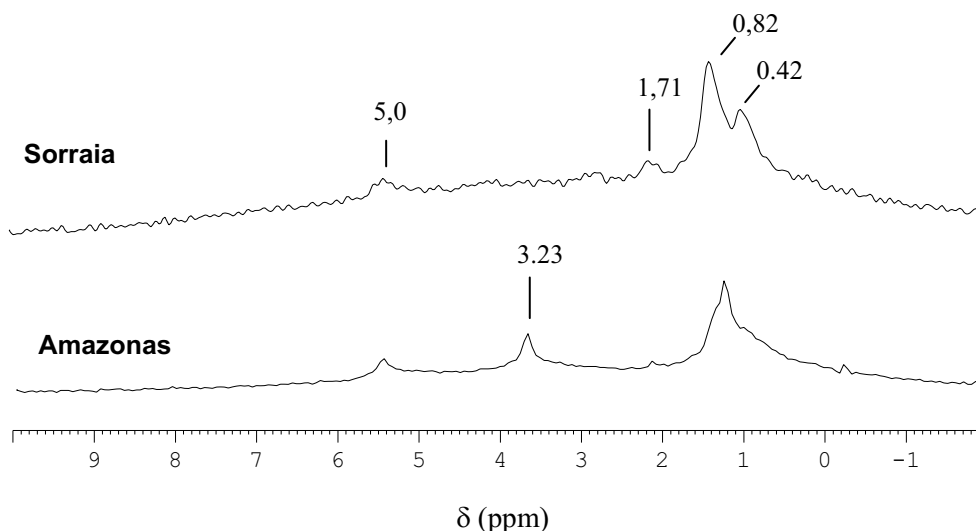


Figura 3.21 - Espectros de ^1H -MAS das farinhas Amazonas e Sorraia secas, SR= 5kHz; farinha Sorraia, ns= 32; farinha Amazonas, ns = 32

Verifica-se que o componente estreito dos espectros de ambas as farinhas reflecte essencialmente a presença de lípidos residuais, indicados pelos sinais a 0,4-1,7 ppm, 3,23 ppm e a 5,0 ppm. Os primeiros sinais (baixo ppm) são atribuídos aos protões dos

grupos metilo ($-\text{CH}_3$ e $-(\text{CH}_2)_n-$), enquanto que o sinal a 5,0 ppm é atribuído aos prótons olefinicos ($-\text{HC}=\text{CH}-$).

III. 3.3.2.2. Efeito do método de preparação

Antes de se efectuar o estudo do efeito da hidratação ao nível dos espectros de próton, procedeu-se primeiramente ao estudo do efeito do método de preparação, no sentido de discriminar diferenças inerentes ao modo de preparação das amostras. A Figura 3.22 apresenta os espectros de ^1H -MAS para as amostras de farinha da variedade SOR preparadas pelos métodos 1 (método de massa desenvolvida) e 2 (método de massa não desenvolvida).

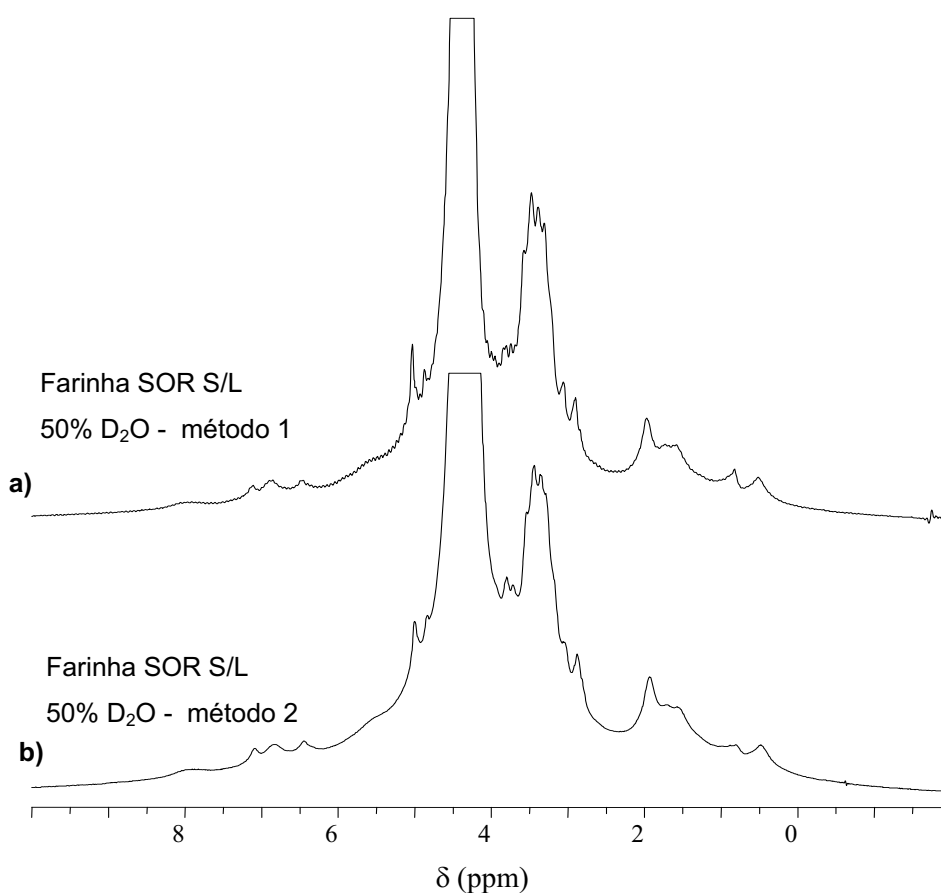


Figura 3.22 - Espectros de RMN de ^1H -MAS das amostras de farinha da variedade Sorraia hidratadas a 50% (m/m) pelo (a) método 1 e (b) método 2; todos os espectros adquiridos com SR= 5kHz e ns= 32.

A largura a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) do sinal da água variou entre as amostras preparadas pelos dois métodos, observando-se um valor de $\Delta\nu_{1/2}$ de cerca de 42 Hz para a amostra preparada pelo método 2, e cerca de 35 Hz para a amostra preparada pelo método 1. A variação da $\Delta\nu_{1/2}$ do pico da água dá uma ideia do comportamento dinâmico da água no sistema, bem como da sua participação em trocas químicas com outros componentes. O alargamento da banda da água no espectro de próton da amostra preparada pelo método 2 parece indicar que nesta amostra a água encontra-se mais rígida e apresenta uma diferente cinética de trocas químicas. Os valores de T_{2H} registados para estas duas amostras (ver III.3.3.2.5) mostram que na amostra preparada pelo método 2, a água apresentou um comportamento monoexponencial, apresentando apenas um componente de T_{2H} , indicando uma maior homogeneidade da distribuição da água. Por sua vez, a amostra preparada pelo método 1 apresentou um comportamento biexponencial, indicando que a água se encontra distribuída em dois ambientes diferentes.

Tendo em conta a maior homeogeneidade da distribuição da água para o método 2, tal como revelada pelos tempos de relaxação, apenas o método 2 é referenciado na discussão do efeito da hidratação e do tratamento térmico nas amostras de farinha AMA e SOR.

III. 3.3.2.3. Efeito da hidratação

Os espectros de ^1H -MAS das amostras de farinha hidratadas a 50% D_2O (m/m) pelo método 2 estão apresentados na Figura 3.23 para as amostras da variedade SOR, deslipidificadas, e da variedade AMA, originais e deslipidificadas.

Ao nível dos espectros de próton, a hidratação das amostras de farinha conduziu a alterações bastante significativas nos espectros de ^1H -MAS, tal como se pode verificar pela comparação dos espectros no estado hidratado (Figura 3.23) com os espectros no estado seco apresentados na Figura 3.21. O efeito da hidratação nos espectros de próton foi semelhante para as farinhas de ambas as variedades. O componente largo desapareceu quase totalmente, tendo os espectros de próton das amostras de farinha hidratadas apresentado uma escala de ppm bastante mais estreita devido ao elevado acréscimo da mobilidade de todos os componentes na amostra. Os espectros apresentaram um perfil bastante mais complexo do que os espectros das amostras

secas, apresentando um maior número de sinais, mais ou menos resolvidos, como resultado do aumento de mobilidade dos componentes do sistema. Na Figura 3.23, os sinais estão numerados de modo a facilitar a sua identificação, e as respectivas atribuições, baseadas em trabalhos publicados anteriormente (Wüthrich, 1986; Sacco *et al.*, 1998; Alberti, 2000), estão apresentadas na Tabela 3.3.

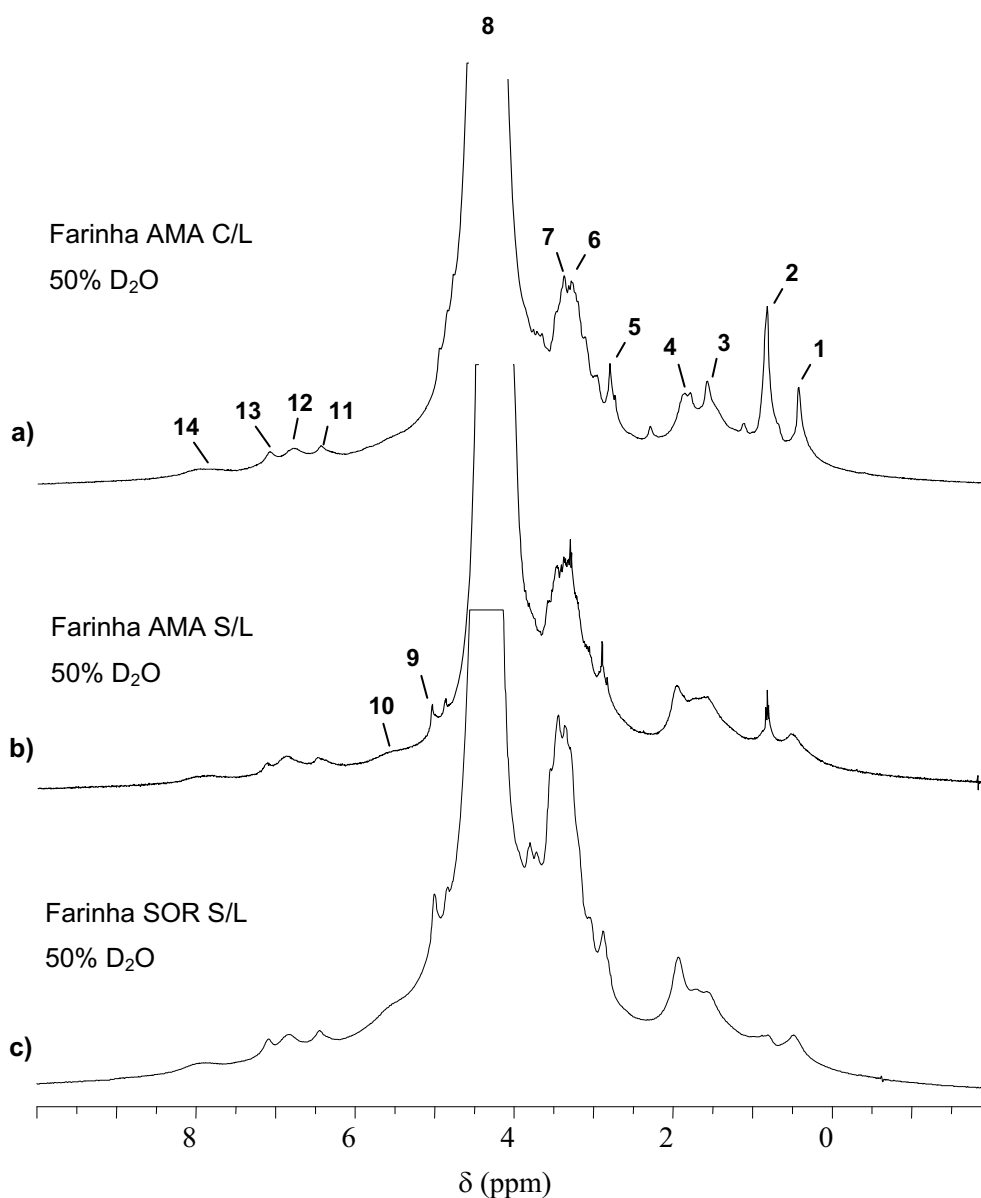


Figura 3.23- Espectros de RMN de ^1H -MAS das amostras de farinha hidratadas a 50% D_2O (m/m) pelo método 2; SR= 5kHz; a)- farinha Amazonas original; ns=32; b) - farinha Amazonas deslipidificada, ns=32; c)- farinha Sorraia deslipidificada, ns= 32

Tabela 3.3 - Atribuições para os principais sinais dos espectros de RMN de ^1H -MAS da farinha Amazonas, com base em trabalhos publicados por Wüthrich (1986), Sacco *et al.* (1998) Alberti (2000).

Pico Nº	δ (ppm)	Atribuição / Tipo de Protão	
1	0,42	Proteínas e lípidos	CH_3^-
2	0,82		CH_3^-
3	1,79	Proteínas e lípidos	$-\text{CH}_2^-$
4	1,86		$-\text{CH}_2^-$
5	2,80	Amido (H2 -H6); proteína (região alfa)	$-\text{CHOH}$
6	2,96		$-\text{CHOH}$
7	3,28		$-\text{CHOH}$
8	4,34	Água (HOD)	
9	4,94	lípidos	$\text{HC}=\text{CH}$
10	5,31	Amido (H1)	$-\text{CHO}$
11	6,43	Proteínas Protões aromáticos	$-\text{NH}_2$
12	6,76	Proteínas Protões de cadeias laterais	$-\text{NH}_2$
13	7,07		
14	8,01	Proteínas Protões de cadeia central	$-\text{NH}$

O perfil observado para os espectros das amostras de farinha hidratadas é bastante semelhante ao perfil de um sistema de amido hidratado (ver § VI. 3.3.2.2), reflectindo o efeito dominante do amido. No sentido de melhor comparar os espectros entre si, os espectros foram ajustados na escala de ppm de modo a tomar como referência o sinal a 0,82 ppm (pico 2), particularmente atribuído aos protões dos grupos metilo. Todos os espectros de ^1H -MAS são dominados pelo pico mais intenso a 4,4 ppm (pico 8), atribuído à água (HOD). Entre 0-2 ppm é possível verificar a contribuição da região alifática proveniente quer das proteínas do glúten, quer dos lípidos. A 2,8-3,5 ppm (picos 5-7) surge a região atribuída à ressonância dos protões anoméricos (H2-H6)

dos anéis de glucose do amido, com a sobreposição da contribuição de alguns prótons alfa das proteínas do glúten.

A 5,3 ppm (pico 10) aparece um sinal, embora largo e de fraca intensidade, derivado do próton H1 dos anéis de glucose do amido. Os sinais observados a 6-8 ppm (pico 11-14) surgem da contribuição dos prótons $-NH_2$ das cadeias laterais dos resíduos de glutamina e dos prótons dos anéis aromáticos de alguns aminoácidos (e.g. tirosina), bem como dos prótons $-NH$ das cadeias centrais dos resíduos de glutamina.

As amostras de farinha AMA originais e deslipidificadas apresentaram uma resposta semelhante ao efeito da hidratação com a exceção da contribuição dos lípidos. Tal como esperado, a amostra de farinha AMA original (Figura 3.23a) apresentou os sinais dos lípidos (picos 1 e 2) bem mais resolvidos e mais intensos do que a amostra de farinha AMA sem lípidos (Figura 3.23b).

Em suma, a hidratação das amostras de farinha conduziu a um aumento generalizado da mobilidade de todos os componentes, como resultado do efeito plasticizante da água.

III. 3.3.2.4. Efeito do tratamento térmico 20-80-20°C

O efeito do aquecimento das amostras de 20°C a 80°C e posterior arrefecimento de 80°C a 20°C foi também acompanhado por espectroscopia de RMN de 1H -MAS. A Figura 3.24 apresenta os espectros de 1H -MAS para a amostra de farinha SOR deslipidificada preparada pelo método 2. Nesta secção apenas se apresentam os espectros para uma das variedades e apenas para um dos métodos, uma vez que o efeito observado foi semelhante entre as variedades. O pico do grupo metilo a 0,82 ppm foi tomado como referência interna para a comparação dos espectros às várias temperaturas, já que o desvio químico dos prótons do metilo não se deverá alterar com o aumento da temperatura (Alberti, 2000).

De um modo geral, com o aquecimento (Figura 3.24 espectros a-c), verificou-se um aumento da resolução de todos os sinais, apontando para um aumento da mobilidade por efeito do aumento da temperatura do sistema. O aumento da resolução, e portanto o aumento da mobilidade, resulta da diminuição dos tempos de correlação e do aumento dos tempos de relaxação T_{2H} , tal como será referido posteriormente.

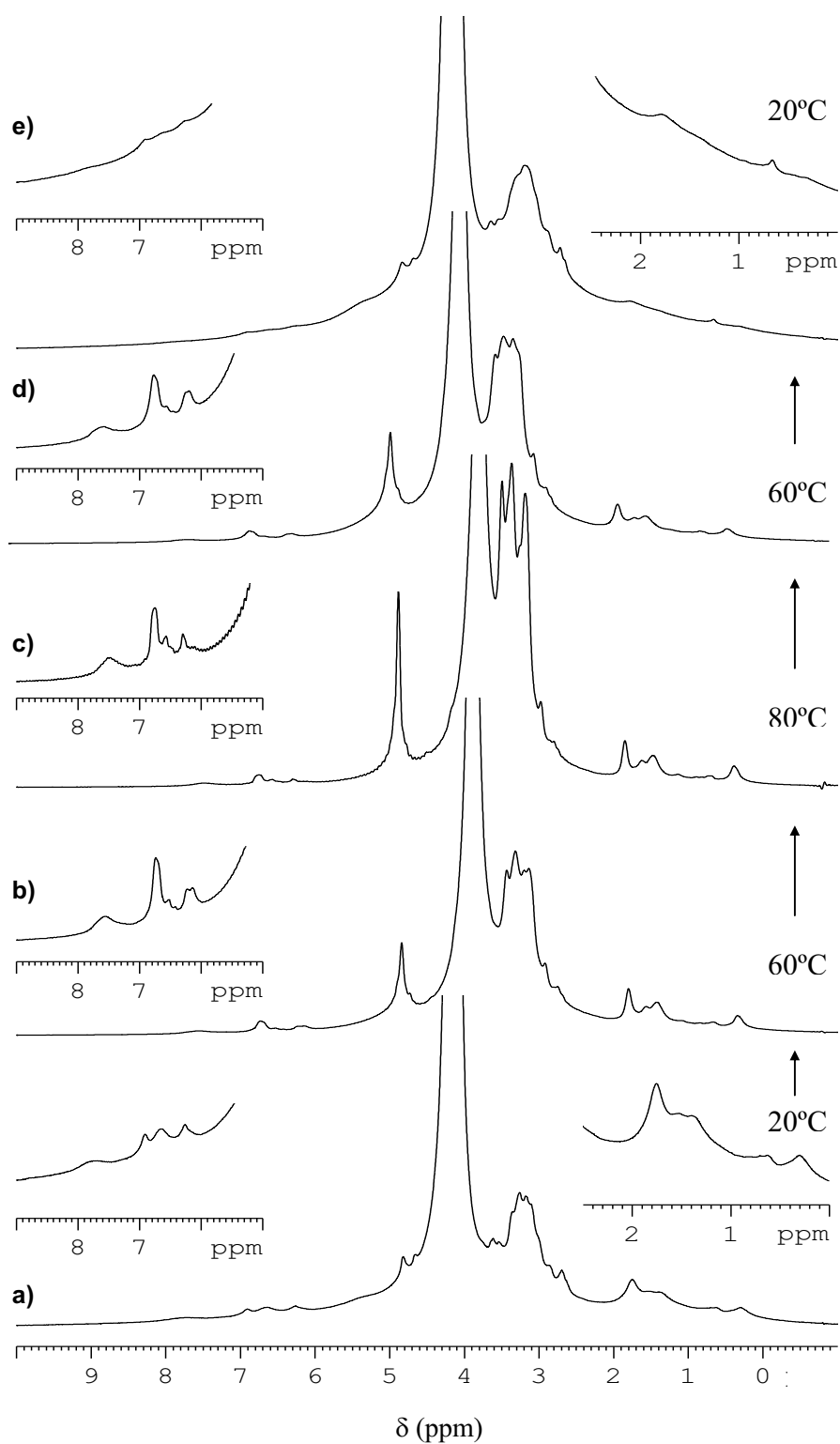


Figura 3.24 - Espectros de RMN de ^1H -MAS de uma amostra de farinha SOR hidratada a 50% D_2O (m/m) pelo método 2, registados durante o aquecimento (20-80°C) e durante o arrefecimento (80-20°C), SR= 5kHz, ns=32

O efeito mais marcante do aquecimento do sistema foi observado para os sinais do amido a 2,8-3,5 ppm (H2-H6) e a 5.3 ppm (H1). Com a elevação da temperatura, os sinais do amido de mais baixo desvio químico aumentaram bastante de intensidade, aparecendo como um gomo na linha do pico da água, como resultado do alargamento do pico da água, a 80°C. O sinal do H1, que no espectro inicial aparecia sob a forma de um ombro, aumentou bastante de resolução e de intensidade, o que indica um aumento de mobilidade para estes prótons. O aumento de mobilidade dos prótons a 2,8-3,5 ppm (H2-H6) e a 5.3 ppm (H1) deverá estar relacionado com o processo de gelatinização do amido.

O aumento de mobilidade após a gelatinização do amido foi também considerado por outros autores (Morgan *et al.*, 1995) que, ao adquirirem espectros de ^{13}C -CP/MAS em amostras de amido recém gelatinizadas, não conseguiram visualizar os sinais de ressonância do amido. A ausência de sinais nos espectros de ^{13}C -CP/MAS resulta do grande aumento de mobilidade. Em contrapartida, nos espectros de ^1H -MAS onde são detectados os componentes mais móveis, o aumento de mobilidade reflecte-se no aumento da intensidade dos sinais.

Os sinais das ressonâncias da região alifática (0-2 ppm) também aumentaram de intensidade e de resolução por efeito do aumento da temperatura. Os lípidos tornaram-se também mais móveis, o que é confirmado pela melhoria da resolução dos sinais correspondentes, ao longo do aquecimento.

Dada a fraca intensidade dos sinais na zona de elevado desvio químico, comparativamente aos sinais do amido e da água, a Figura 3.24 apresenta numa escala mais ampliada, para cada uma das temperaturas analisadas, a porção do espectro (6-8 ppm) onde se encontram as ressonâncias dos prótons -NH, -NH₂ e H-aromáticos. Uma análise mais pormenorizada revela que o aquecimento promoveu um aumento de resolução de todos estes sinais, sobressaindo o aumento da intensidade do pico a 6,8 ppm (prótons -NH de cadeia lateral) o que indica que os prótons amídicos de cadeia lateral se tornaram mais móveis. Com o aumento da temperatura, verificou-se ainda o deslocamento do desvio químico dos picos dos prótons -NH para valores mais baixos um comportamento característico dos hidrogénios dos grupos -NH que participam em ligações de hidrogénio. O sinal a 7,1 ppm (prótons -NH das cadeias laterais das glutaminas) deslocou-se para mais baixo desvio químico, juntando-se com o sinal a

6,8 ppm, como resultado do aumento significativo da mobilidade destes prótons, provavelmente devido à quebra das ligações de hidrogénio provocada pelo aquecimento do sistema. Este efeito foi igualmente observado para o glúten, tal como será explicado no capítulo 4.

Durante o arrefecimento (Figura 3.24 espectros c-e), foi observada uma diminuição geral da resolução dos espectros, indicando um aumento da rigidez do sistema. A diminuição da mobilidade é suportada pela diminuição dos valores dos tempos de relaxação T_{2H} e portanto, pelo aumento dos tempos de correlação. Os sinais do amido (2,8-3,5 ppm e 5,3 ppm) diminuíram de intensidade. O sinal a 5,3 ppm recuperou a intensidade inicial, apresentando-se como um sinal largo sob a forma de um ombro na linha do espectro. O sinal a 2,8-3,5 ppm não recuperou completamente a intensidade inicial observando-se uma diminuição da resolução, o que indica alguma alteração do ambiente em torno destes prótons provavelmente devido a uma maior imobilização. Este aumento da rigidez é confirmado pelo aumento do tempo de relaxação T_{1H} e diminuição do tempo de relaxação T_{2H} , tal como será discutido a seguir (§ III.3.3.2.5.2) Os picos provenientes da contribuição do glúten diminuíram bastante de intensidade e de resolução, tal como se pode visualizar nos insertos da Figura 3.24 - espectro (e), revelando um comportamento irreversível por efeito do tratamento térmico. Este comportamento observado para o glúten deverá estar relacionado com a alteração da conformação das proteínas, normalmente traduzida pela desnaturação da proteína, ou com o estabelecimento de novas ligações dissulfito durante o aquecimento, reforçando a estrutura da matriz proteica, conferindo-lhe assim uma menor mobilidade. Na região alifática (ver inserto do lado direito, espectro (e)), verifica-se que os sinais derivados da contribuição das proteínas e lípidos diminuíram bastante de intensidade, como resultado da imobilização dos prótons alifáticos das proteínas. O tratamento térmico parece não ter afectado significativamente os lípidos, observando-se o sinal a 0,82 ppm como indicação da mobilidade presente desses compostos.

Tal como já era esperado (Wishart *et al.*, 1995) o pico da água deslocou-se para valores de desvio químico mais baixos ao longo do aquecimento. Com o aquecimento, a força das ligações de hidrogénio varia com a temperatura, tornando-se mais fracas, verificando-se então a alteração do desvio químico da água. Após o arrefecimento, a

água aproximou-se da sua posição inicial no desvio químico, sugestionando uma reversibilidade do comportamento da água ao longo do ciclo de aquecimento/arrefecimento. A tendência para um comportamento reversível foi confirmada pelo comportamento dos tempos de relaxação T_{1H} e T_{2H} . Porém, para a amostra da variedade AMA, apesar de os valores de T_{1H} sugerirem um comportamento reversível, os valores de T_{2H} apresentaram um comportamento irreversível tal como será discutido em III.3.3.2.5.

A largura a meia altura ($\Delta v_{1/2}$) do sinal da água também variou ao longo do ciclo de aquecimento/arrefecimento, tal como é possível verificar na Figura 3.25. Com o aquecimento, a $\Delta v_{1/2}$ do pico da água aumentou em todas as amostras, voltando depois a diminuir, não recuperando no entanto a largura inicial.

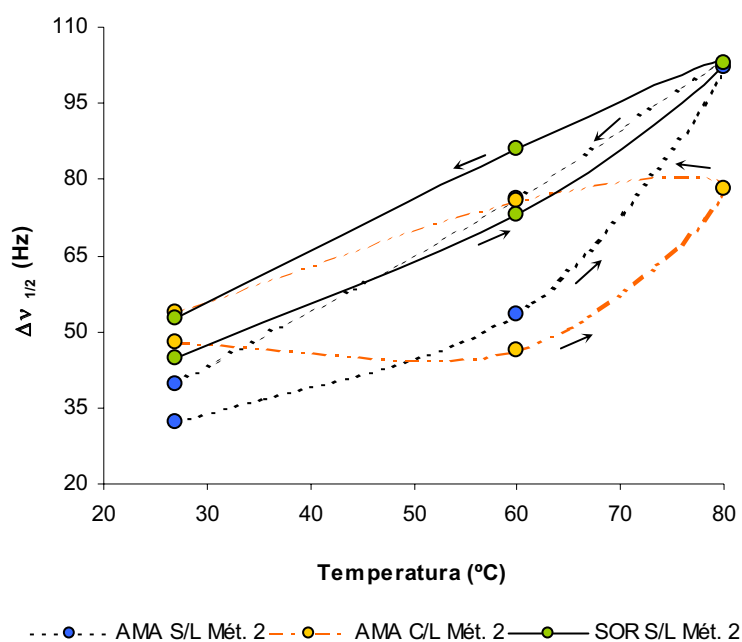


Figura 3.25 - Variação da largura a meia altura do pico da água em função da temperatura, para as amostras de farinha AMA originais e deslipidificadas preparadas pelo método 2, e de farinha SOR deslipidificada preparada pelo método 2.

O aumento da $\Delta v_{1/2}$ do pico da água ao longo do aquecimento pode ser interpretado como uma diminuição da mobilidade da água, tal como é confirmado pela diminuição dos tempos de relaxação T_{2H} (ver § III.3.3.2.5.2). A maior imobilização da água

poderá estar relacionada com o processo hidrotérmico que os grânulos de amido sofrem durante o aquecimento. Com o aumento da temperatura, os grânulos de amido aumentam bastante de volume, por uma maior absorção de água. Com o arrefecimento, a cinética de trocas químicas é alterada, a água recupera a sua mobilidade, reflectindo-se, portanto, na diminuição da $\Delta\nu_{1/2}$ da banda da água.

Por observação da Figura 3.25 verifica-se que o comportamento da $\Delta\nu_{1/2}$ do pico da água foi um pouco diferente entre as farinhas das duas variedades, o que poderá ser o reflexo de uma diferente organização molecular ou de uma diferente dinâmica da água nos diferentes sistemas. Apesar de a 80°C ambas as variedades de farinha (deslipidificadas) apresentarem $\Delta\nu_{1/2}$ semelhante, a farinha AMA apresentou uma subida mais acentuada da $\Delta\nu_{1/2}$ da banda da água do que a farinha SOR, sobretudo entre 60°C e 80°C.

Um diferente comportamento da $\Delta\nu_{1/2}$ do pico da água foi também observado entre a farinha original e a farinha deslipidificada da farinha AMA. A presença de lípidos parece ter retardado o aumento da $\Delta\nu_{1/2}$ do pico da água ao longo do aquecimento, o que poderá estar relacionado com uma diferente dinâmica da água devido ao efeito hidrofóbico dos lípidos.

III. 3.3.2.5. Efeito do tratamento térmico nos tempos de relaxação longitudinal (T_{1H}) e transversal (T_{2H}) de Protão

O comportamento da água, bem como o dos outros componentes, ao longo do ciclo de aquecimento/arrefecimento foi seguido pela dinâmica de relaxação através dos valores dos tempos de relaxação longitudinal (T_{1H}) e relaxação transversal (T_{2H}). Os valores de T_{1H} reflectem a proximidade dos componentes na amostra, dada a eficiência de difusão de spin, fornecendo também informação sobre o grau de mobilidade, na ordem dos MHz, destes mesmos componentes. A variação dos valores de T_{2H} fornece informação sobre a variação da mobilidade geral de cada componente, incluindo a frequências mais reduzidas, na ordem dos kHz. Valores mais elevados de T_{2H} indicam um aumento da mobilidade devido à diminuição dos tempos de correlação.

De seguida, apresenta-se primeiro a análise da variação dos tempos de relaxação T_{1H} e T_{2H} ao longo da temperatura para as duas variedades de farinha preparadas pelo método 2, por ter sido este o método seleccionado para o estudo do efeito do

tratamento térmico nas amostras de farinha. No final (§ III.3.3.2.5.3) é apresentado o efeito dos dois métodos de preparação das amostras da variedade SOR no comportamento do T_{1H} e do T_{2H} .

III. 3.3.2.5.1. Tempo de relaxação T_{1H}

Os tempos de relaxação T_{1H} foram medidos a várias temperaturas para as amostras de farinha de ambas as variedades. Os valores de T_{1H} medidos no estado sólido são altamente dependentes das velocidades de rotação aplicadas (Alberti, 2000), pelo que todos os valores de T_{1H} foram obtidos à mesma velocidade de rotação (5 kHz). A variação dos valores dos tempos de relaxação longitudinal T_{1H} com a temperatura para os picos principais está apresentada na Tabela 3.4, onde se apresentam os resultados para as amostras de farinha das variedades AMA e SOR, deslipidificadas, preparadas pelo método 2, bem como para a amostra de farinha da variedade SOR, deslipidificada, preparada pelo método 1 (o efeito do método de preparação nos valores de T_{1H} será discutido na secção III.3.3.2.5).

Por observação da Tabela 3.4, verifica-se que, à temperatura ambiente (20°C (1)), as amostras de farinha AMA e SOR preparadas pelo método 2 apresentaram uma boa aproximação entre todos os componentes, tendo estes apresentado valores de T_{1H} bastante próximos entre si, na ordem dos 0,9-1,0 s, para ambas as variedades. A proximidade dos valores de T_{1H} entre os componentes reflecte uma eficiente difusão de spin, revelando a obtenção de amostras com elevado grau de homogeneidade.

Com o aquecimento até 80°C, a dinâmica molecular nas duas amostras de farinha AMA e SOR foi alterada, tendo-se observado, para a maioria dos componentes, um aumento generalizado dos valores de T_{1H} .

Um aumento dos valores de T_{1H} poderá significar um aumento de mobilidade no caso de sistemas líquidos, ou uma diminuição da mobilidade no caso de sistemas sólidos (§ I.2.2.3.1). Como o sistema em estudo é semi-sólido, a interpretação do comportamento do T_{1H} aqui observado requer a ajuda de outros parâmetros, tais como o T_{2H} (ver § III.3.3.2.5.2.).

À temperatura máxima de aquecimento, a amostra de farinha AMA apresentou valores de T_{1H} na gama dos 0,8-3,7 s, uma gama mais alargada comparativamente à observada para a farinha da variedade SOR (0,8-1,4 s). Para aquela amostra, observa-se uma boa proximidade dos prótons $-NH_2$ e aromáticos com a água (tendo em conta o erro associado), observando-se um maior afastamento dos prótons do amido (3,5 ppm) e dos prótons alifáticos (1,9 ppm). Para a amostra da variedade SOR, uma boa proximidade é observada entre os prótons $-NH_2$ da proteína, a água e o amido, observando igualmente um maior afastamento dos prótons alifáticos.

Após o arrefecimento até 20°C (20°C (2)), foi observado um novo aumento dos valores de T_{1H} para ambas as amostras de farinha AMA e SOR. O aumento dos valores de T_{1H} pode ser interpretado como um aumento da rigidez dos sistemas, o qual é confirmado pela diminuição dos valores de T_{2H} (§ III.3.3.2.5.2). Para ambas as amostras verifica-se ainda uma boa proximidade entre o amido e a água, estando os grupos proteicos mais afastados destes dois componentes. O maior afastamento da proteína deverá estar relacionado com a desnaturação da matriz proteica.

Ao longo do ciclo de aquecimento/arrefecimento, a água apresentou um comportamento do T_{1H} um pouco diferente entre as duas variedades de farinha preparadas pelo mesmo método. O diferente comportamento foi observado sobretudo durante o arrefecimento.

Para as duas amostras de farinha, o aquecimento até 80°C conduziu a um aumento do valor de T_{1H} da água, o que deverá ser interpretado como uma diminuição da mobilidade deste componente nas amostras, dada a tendência para a diminuição dos valores de T_{2H} observada (III.3.3.2.5.2). A maior imobilização da água sugere, mais uma vez, uma alteração da cinética de trocas químicas entre a água e os outros componentes por efeito do aquecimento, tal como já anteriormente verificado pelo aumento do valor da $\Delta v_{1/2}$ do pico da água com a subida da temperatura. No entanto, contrariamente ao observado para o comportamento da $\Delta v_{1/2}$ do pico da água, após o arrefecimento os valores de T_{1H} apresentaram um comportamento não reversível. Para a amostra da variedade SOR observou-se uma subida do valor de T_{1H} , enquanto que para a amostra da variedade AMA foi observada uma diminuição do valor de T_{1H} , porém não recuperando o valor inicial. No caso da amostra da variedade SOR, a subida do valor de T_{1H} sugere uma tendência para

que a água se encontre predominantemente no seu estado livre, o que é apoiado pelo aumento do valor de T_{2H} registado para esta amostra. No caso da amostra de farinha da variedade AMA, apesar da manifestação de um acréscimo de mobilidade, a água parece encontrar-se ainda bastante ligada, o que é indicado pela diminuição do valor de T_{1H} e pelo aumento do valor de T_{2H} da água registado para esta amostra. Para a amostra de farinha AMA, o processo de retrogradação não terá ocorrido em extensão suficiente para a separação da água do amido (sinérese) e recristalização das moléculas de amilose e amilopectina, estando parte da água ainda no estado ligado.

III. 3.3.2.5.2. Tempo de relaxação T_{2H}

Para as mesmas amostras analisadas na secção anterior, e para as mesmas temperaturas, foram igualmente determinados os tempos de relaxação T_{2H} . Os valores de T_{2H} medidos para os principais componentes, estão indicados nas Tabelas 3.5, 3.6 e 3.7, respectivamente para as temperaturas 20°C - antes do aquecimento, 80°C e 20°C - depois do aquecimento.

Para alguns sinais e para algumas temperaturas, os tempos de relaxação de T_{2H} apresentaram um comportamento bi-exponencial, traduzido pelo registo de dois valores de T_{2H} (T_{2A} e T_{2B}). A existência de duas constantes de tempo indica a presença no sistema de duas fracções de prótons com mobilidades distintas. A constante T_{2A} corresponde à fracção mais imóvel, apresentando valores de T_{2H} mais curtos, e a constante T_{2B} representa a fracção mais móvel, apresentando valores de T_{2H} mais longos.

À temperatura ambiente, antes do aquecimento (Tabela 3.5), a amostra de farinha da variedade SOR preparada pelo método 2 apresentou predominantemente apenas um valor de T_{2H} para a grande maioria dos componentes, indicando uma homogeneidade geral da amostra, um aspecto já atrás verificado pela proximidade dos valores de T_{1H} .

Contrariamente ao observado para a farinha SOR, os componentes da amostra de farinha AMA preparada pelo método 2 apresentaram um comportamento bi-exponencial do T_{2H} , revelando a existência de uma diferente dinâmica.

Da comparação dos valores de T_{2H} registados para as duas amostras a 20°C, destacam-se as diferenças nos valores de T_{2H} da água (4,4 ppm) e dos prótons-NH de cadeia lateral e

aromáticos das proteínas (7,1 ppm). Os valores de T_{2H} da água serão discutidos mais tarde. Comparando os valores de T_{2H} dos grupos $-NH_2$ verifica-se que a variedade SOR apresentou apenas um valor de T_{2H} , indicando um ambiente homogêneo de mobilidade para estes prótons. A amostra AMA apresentou dois valores de T_{2H} , revelando dois ambientes com mobilidades distintas para a mesma espécie de prótons. No entanto, esta amostra apresentou valores de T_{2H} bastante mais baixos do que a amostra SOR, e uma percentagem muito baixa da população de prótons móveis, indicando uma tendência para uma maior rigidez.

Com o aquecimento até 80°C (Tabela 3.6), observa-se uma subida generalizada dos valores de T_{2H} para a amostra de farinha SOR, indicando um aumento da mobilidade geral da amostra. Para esta amostra observa-se ainda que a maioria dos componentes apresentou agora dois valores de T_{2H} , o que indica que o aquecimento promoveu a existência de dois ambientes com mobilidades distintas.

Para a amostra de farinha da variedade AMA, verificou-se um comportamento bastante diferente do da amostra da variedade SOR preparada pelo mesmo método. Com o aquecimento a 80°C, os valores de T_{2H} apresentaram um comportamento monoexponencial, apresentando uma diminuição bastante acentuada dos valores de T_{2H} , sinónimo de uma grande diminuição da mobilidade do sistema.

Apesar do comportamento semelhante observado ao nível do T_{1H} (§III.3.3.2.5.1), o diferente comportamento observado ao nível do T_{2H} sublinha uma diferente dinâmica molecular existente entre as duas variedades de farinhas, durante o aquecimento, o que poderá estar relacionado com o diferente grau de dureza das duas variedades.

Após o arrefecimento (Tabela 3.7), verificou-se que o comportamento ao nível do T_{2H} foi irreversível para ambas as amostras. A amostra de farinha SOR, apresentou alguns componentes com um comportamento bi-exponencial, tendo-se no entanto observado uma diminuição da percentagem de prótons móveis nos componentes que apresentaram dois valores de T_{2H} , indicando uma diminuição da mobilidade. No entanto, os valores de T_{2H} são relativamente semelhantes aos registados inicialmente (dado o erro experimental associado), indicando a presença ainda de alguma mobilidade na amostra.

Tabela 3.6- Valores dos tempos de relaxação transversal - T_{2H} - para as amostras de farinha Amazonas e Sorraia deslipidificadas - 80°C

δ (ppm)	Atribuição	T_{2H} (ms) - 80°C							
		Farinha AMA - Método 2				Farinha SOR - Método 2			
		T_{2A} /ms	T_{2B} /ms	% protões móveis (T_{2B})	T_{2A} /ms	T_{2B} /ms	% protões móveis (T_{2B})	T_{2A} /ms	T_{2B} /ms
0,82	Lípidos	n.d.	-	-	0,0217 \pm 0,0055	7,80 \pm 0,63	47	1,73 \pm 0,61	17,8 \pm 3,6
1,9	Proteína + Lípidos	0,0060 \pm 0,0010	-	-	0,0226 \pm 0,0048	9,48 \pm 0,21	75	2,36 \pm 0,91	14,4 \pm 2,7
3,5	Amido (H2-H6) + proteína	0,0042 \pm 0,0009	-	-	0,0362 \pm 0,0082	5,74 \pm 0,18	78	-	6,42 \pm 0,36
4,4	HOD	0,00130 \pm 0,00009	-	-	-	2,24 \pm 0,19	-	-	2,60 \pm 0,16
5,3	Amido (H1)	n.d.	-	-	-	5,77 \pm 1,03	-	0,0554 \pm 0,0298	17,1 \pm 0,7
7,1	Proteína -NH e aromáticos	n.d.	-	-	0,119 \pm 0,134	12,5 \pm 0,4	65	0,366 \pm 0,029	12,3 \pm 0,3

(n.d. - não detectável)

Para a amostra da variedade AMA, todos os componentes apresentaram um comportamento monoexponencial, e os valores de T_{2H} foram todos bastante mais baixos do que os registados antes do tratamento térmico, indicando a formação de uma matriz homogénea e bastante mais rígida do que na amostra de farinha SOR. Este resultado deverá estar relacionado com o processo de desnaturação da proteína. Os valores de T_{1H} observados para esta amostra (ver secção anterior) mostraram que o processo de desnaturação proteica teve início logo aos 80°C, tendo este processo, no final do tratamento térmico, provavelmente ocorrido numa maior extensão, contribuindo para uma maior rigidez de toda a amostra.

A água apresentou um comportamento do T_{2H} qualitativamente semelhante entre as duas amostras ao longo do tratamento térmico, apresentando no entanto valores de T_{2H} com magnitudes bastante diferentes. Antes do aquecimento, a amostra de farinha AMA apresentou um valor de T_{2H} da água bastante mais baixo do que o da amostra da variedade SOR, o que indica que, à temperatura ambiente, a água encontra-se bastante mais imobilizada na amostra da variedade AMA. Porém, com o aquecimento e para as duas amostras de farinha, a água apresentou uma descida dos valores de T_{2H} , o que indica que esta se tornou mais imobilizada em ambas as amostras por efeito da temperatura, apresentando uma mobilidade homogénea em toda a matriz, tal como revelado pelo seu comportamento mono-exponencial. Com o arrefecimento, os valores de T_{2H} da água voltaram a subir, revelando alguma ou total recuperação da mobilidade inicial, respectivamente para as amostras AMA e SOR. Após o tratamento térmico, a água continuou a apresentar apenas um valor de T_{2H} , reflectindo uma homogeneidade da sua distribuição na amostra.

Tabela 3.7- Valores dos tempos de relaxação transversal - T_{2H} - para as amostras de farinha Amazonas e Sorraia deslipidificadas- depois do tratamento térmico (20°C)

		T _{2H} (ms) - 20°C (depois do aquecimento)									
δ (ppm)	Atribuição	Farinha AMA - Método 2			Farinha SOR - Método 2			Farinha SOR - Método 1			
		T _{2A} /ms	T _{2B} /ms	% protões móveis (T _{2B})	T _{2A} /ms	T _{2B} /ms	% protões móveis (T _{2B})	T _{2A} /ms	T _{2B} / ms	% protões móveis (T _{2B})	
0,82	Lípidos	0,0373 ± 0,0043	-	-	0,0455 ± 0,0021	10,8 ± 0,3	64	0,0367 ± 0,076	9,11 ± 0,65	94	
1,9	Alifáticos	0,00499 ± 0,00009	-	-	0,0391 ± 0,0050	0,772 ± 0,104	38	0,0218 ± 0,0105	0,856±0,141	53	
3,5	Amido	0,00020 ± 0,00002	0,0045 ± 0,0004	41	0,0644 ± 0,0129	6,14 ± 0,93	36	0,0807 ± 0,0153	4,50 ± 0,47	56	
4,4	HOD	0,0050 ± 0,0001	-	-	-	3,79 ± 0,66	-	-	5,07 ± 0,08	-	
5,3	Amido	N.D.	-	-	0,811 ± 0,186	-	-	0,379 ± 0,055	6,00 ± 0,89	39	
7,1	Proteínas - NH e aromáticos	0,00011 ± 0,00008	-	-	0,206 ± 0,092	-	-	0,321 ± 0,044	-	-	

(n.d. - não detectável)

III. 3.3.2.5.3. Efeito do método de preparação nos valores de T_{1H} e T_{2H}

O efeito do método de preparação nos valores de T_{1H} e T_{2H} foi analisado para a amostra de farinha da variedade SOR. Os valores dos tempos de relaxação da amostra preparada pelo método 1 encontram-se nas mesmas tabelas onde estão apresentados os respectivos valores para a amostra preparada pelo método 2.

Por comparação dos valores de T_{1H} apresentados na Tabela 3.4, verifica-se que, antes do aquecimento (20°C (1)), a amostra de farinha SOR preparada pelo método 1, apresentou uma maior variação dos valores de T_{1H} , tendo apresentado essencialmente três grupos de valores de T_{1H} . O método 1 parece ter promovido uma maior separação entre os principais componentes, ao contrário do observado para o método 2. A introdução de mistura mecânica durante a preparação da amostra pelo método 1 poderá ter favorecido a criação de uma matriz com uma distribuição mais heterogênea dos vários componentes. No entanto, os valores apresentados encontram-se na mesma gama dos registados para a amostra preparada pelo método 2, à mesma temperatura de análise. A água apresentou um valor de T_{1H} da mesma ordem do apresentado pela amostra preparada pelo método 2, o que indica que o método não parece ter exercido influência sobre a mobilidade da água nas amostras.

Com o aquecimento, os valores de T_{1H} aumentaram, indicando um aumento da mobilidade geral dos vários componentes na amostra, tal como confirmado pelo aumento dos valores de T_{2H} . Este efeito foi igualmente observado para a amostra preparada pelo método 2. No caso da farinha SOR preparada pelo método 1, verifica-se ainda uma maior aproximação entre todos os componentes dada a aproximação dos valores de T_{1H} , tendo em conta a gama de incerteza associada. Aos 80°C, a água apresentou um valor de T_{1H} afectado de uma grande incerteza, pelo que é difícil interpretar a variação do T_{1H} deste componente nesta amostra por efeito da subida da temperatura.

Após o arrefecimento verifica-se uma subida generalizada dos valores de T_{1H} , à semelhança do observado para a amostra preparada pelo método 2. A subida dos valores indica um aumento da rigidez geral, o que foi confirmado pela variação dos valores de T_{2H} observados para esta amostra, tal como será discutido ao longo desta secção. Os valores de

T_{1H} apresentados encontram-se na mesma ordem de magnitude observada para a amostra preparada pelo método 2, o que parece sugerir que ao nível do T_{1H} o método de preparação não exerceu influência significativa. Ambas as amostras preparadas pelos dois métodos diferentes apresentaram um comportamento qualitativa e quantitativamente semelhante no que diz respeito ao tempo de relaxação T_{1H} .

Relativamente ao tempo de relaxação T_{2H} , verifica-se que, à temperatura ambiente (Tabela 3.5), a farinha preparada pelo método de massa desenvolvida (método1) apresentou dois valores de T_{2H} para todos os sinais, indicando a existência de duas populações com mobilidades distintas, um efeito contrário ao observado para a amostra preparada pelo método de massa não desenvolvida (método 2). Este resultado vem apoiar a interpretação efectuada relativamente ao comportamento do T_{1H} . A mistura mecânica parece ter contribuído para a formação de uma amostra menos homogénea, com zonas caracterizadas por mobilidades distintas.

Com o aquecimento até 80°C (Tabela 3.6), é observada uma subida generalizada dos valores de T_{2H} para ambas as amostras de farinha SOR preparadas pelos dois métodos diferentes, o que indica um aumento da mobilidade nas duas amostras. A água apresentou valores de T_{2H} muito semelhantes entre as duas amostras preparadas pelos dois métodos diferentes. Ambas as amostras apresentaram apenas um valor de T_{2H} , o que indica uma homogeneidade semelhante da distribuição da água nas amostras e uma mobilidade de magnitude comparável entre as duas amostras.

Com o arrefecimento até 20°C, verifica-se uma variação dos valores de T_{2H} relativamente aos valores registados antes do tratamento térmico para a amostra SOR preparada pelo método 1. À excepção dos prótons derivados dos lípidos (0,82 ppm) todos os valores de T_{2H} diminuíram como resultado de uma maior imobilização e, portanto, do alongamento dos tempos de correlação. A água apresentou apenas um componente de T_{2H} indicando que esta se encontra uniformemente distribuída por toda a amostra, apresentando uma mobilidade homogénea em toda a matriz. No entanto, comparando as amostras preparadas pelos dois métodos diferentes, verifica-se que a água apresentou valores de T_{2H} bastante semelhantes (dado o erro experimental associado), o que indica que, após o tratamento térmico, a água apresentou uma mobilidade de magnitude equiparável entre as duas amostras.

III. 4. Conclusões

A caracterização do comportamento reológico fundamental e espectroscópico das farinhas de trigo de duas variedades portuguesas, Amazonas e Sorraia, foi apresentada e analisada neste capítulo.

As diferentes propriedades tecnológicas que distinguem as duas variedades de trigo em estudo, nomeadamente o maior grau de dureza, a maior força de glúten e a maior capacidade de absorção de água demonstrada pela farinha SOR, foram confirmadas na caracterização do comportamento reológico de amostras hidratadas a 50% (m/m). A farinha SOR, considerada uma farinha de carácter duro, apresentou módulos viscoelásticos mais elevados do que a farinha AMA, considerada uma farinha de carácter mole. A partir da espectroscopia de RMN de ^1H foi possível verificar que as duas variedades de farinha, hidratadas a 50% (m/m) pelo mesmo método (método 2), apresentaram uma dinâmica molecular distinta, tal como confirmado a partir do diferente comportamento dos tempos de relaxação T_{2H} . A farinha AMA apresentou dois ambientes com mobilidades distintas. A farinha SOR apresentou apenas um ambiente de mobilidade, pronunciando a obtenção de uma amostra mais homogénea do que a amostra AMA.

O efeito da deslipidificação nas amostras hidratadas a 50% (m/m) foi também abordado. A extracção de lípidos conduziu à formação de massas com valores de G' mais elevados. A presença de lípidos residuais nas amostras de farinha deslipidificadas foi detectada nos espectros de RMN de ^1H , donde se concluí que a extracção de lípidos não foi completa.

As amostras de farinha foram hidratadas segundo dois métodos de hidratação diferentes, o método de massa desenvolvida (método 1) e o método de massa não desenvolvida (método 2). Estes dois métodos diferem entre si no grau de desenvolvimento das massas de farinha. A formação de uma massa mais forte pelo método 1 foi confirmada pelos valores de G' mais elevados apresentados pelas amostras preparadas por este método, comparativamente às amostras preparadas pelo método de massa não desenvolvida. O diferente comportamento reológico observado entre as amostras preparadas pelos dois métodos foi mais pronunciada para as amostras de farinha com lípidos da variedade AMA, o que mais uma vez sugere uma diferente dinâmica nas amostras de farinha inerente à diferença varietal. A partir da espectroscopia de RMN de ^{13}C verificou-se um aumento da

mobilidade em geral para as amostras preparadas pelo método 2. Os tempos de relaxação de próton T_{2H} revelaram uma distribuição mais homogênea da água nas amostras preparadas pelo método de 2, apontando para uma maior eficiência da hidratação quando as amostras são preparadas pelo método de massa não desenvolvida. Para as amostras preparadas pelo método 2, os valores de T_{2H} revelaram ainda uma maior mobilização da água na farinha AMA.

O efeito do tratamento térmico nas amostras de farinha das duas diferentes variedades de trigo foi também analisado. No estudo do comportamento reológico, ambas as amostras de farinha apresentaram curvas de aquecimento/arrefecimento semelhantes, mostrando um perfil típico de sistemas constituídos maioritariamente por amido. Independentemente da variedade, as amostras preparadas pelo método de massa desenvolvida apresentaram uma maior resistência ao aquecimento, tendo apresentado temperaturas de gelatinização superiores às amostras preparadas pelo método de massa não desenvolvida. Para ambas as variedades, as amostras de farinha com lípidos (originais) apresentaram temperaturas de gelatinização mais elevadas do que as amostras deslipidificadas. Independentemente do método de preparação e do teor de lípidos, as amostras de farinha da variedade AMA apresentaram temperaturas de gelatinização mais elevadas do que as amostras de farinha da variedade SOR.

O diferente comportamento observado ao longo do ciclo de aquecimento/arrefecimento foi confirmado a partir a espectroscopia de RMN de 1H , nomeadamente através dos tempos de relaxação. Com o aquecimento observou-se um aumento da mobilidade do sistema no caso da amostra da variedade SOR, enquanto que a amostra da variedade AMA mostrou um aumento da rigidez, sugerindo o início do processo de desnaturação proteica. No caso da variedade SOR, a água, o amido e a proteína apresentaram uma boa proximidade ao longo do aquecimento. No caso da variedade AMA, uma boa proximidade foi observada apenas entre a proteína e a água, observando-se uma maior separação entre a água e o amido, o que poderá estar relacionado com a maior temperatura de gelatinização observada para a farinha AMA.

Os valores de T_{2H} registados para a água revelaram uma maior imobilização deste componente em ambas as amostras por efeito do aumento da temperatura, apresentando uma mobilidade homogênea em toda a matriz. Com o arrefecimento, os valores de T_{2H} da água voltaram a subir, revelando alguma ou total recuperação da mobilidade inicial,

respectivamente para as amostras AMA e SOR. Após o tratamento térmico, a água continuou a apresentar apenas um valor de T_{2H} , reflectindo uma homogeneidade da sua distribuição na amostra.

Após o tratamento térmico, as amostras apresentaram valores de G' mais elevados comparativamente aos registados antes do tratamento térmico, o que estará relacionado como os processos de desnaturação proteica e de retrogradação do amido. A formação de um sistema mais rígido foi confirmada a partir dos espectros de ^{13}C -CP/MAS bem como a partir do aumento dos valores de T_{1H} e diminuição dos valores de T_{2H} . Para ambas as variedades observou-se uma maior separação entre a água e a proteína, o que deverá estar relacionado com a desnaturação da matriz proteica.

As duas técnicas de análise utilizadas na caracterização das duas variedades de farinhas de trigo provaram assim ser complementares. As diferentes características tecnológicas apresentadas pelas farinhas foram verificadas ao nível macromolecular através dos estudos de reologia fundamental realizados neste trabalho. A diferente dinâmica molecular que sustenta o diferente comportamento observado na reologia foi verificada através da espectroscopia de RMN de sólidos.

CAPÍTULO IV

**CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA E ESPECTROSCÓPICA
DO GLÚTEN EXTRAÍDO DAS FARINHAS DE TRIGO
AMAZONAS E SORRAIA**



IV. 1. Introdução

Tal como já anteriormente referido, a funcionalidade de uma farinha de trigo para a produção de um determinado produto depende da quantidade e da qualidade do glúten, o principal componente responsável pelas propriedades viscoelásticas da massa de uma farinha. Diferentes cultivares de trigo apresentam diferente qualidade do glúten, manifestando, conseqüentemente, diferentes propriedades reológicas (Finney, 1943; MacRitchie, 1979; Bloksma e Bushuk, 1988; Schofield, 1994).

O glúten exibe uma singular combinação de duas propriedades físicas: elasticidade e viscosidade. Diferentes razões entre elasticidade e viscosidade são necessárias consoante o tipo de produto final. Na panificação é desejável um glúten com uma elevada elasticidade de modo a reter o dióxido de carbono formado durante a fermentação. Na produção de bolachas, por exemplo, é desejável um glúten com menor elasticidade de modo a que a massa seja facilmente extensível.

O estudo das propriedades viscoelásticas do glúten tem sido objecto de estudo por muitos investigadores, na tentativa de se estabelecer uma relação entre a estrutura e a funcionalidade do glúten, quer a nível molecular (Payne e Corfield, 1979; Payne, 1987; Payne *et al.*, 1981, 1985, 1987a,b; Bietz, 1984; Huebner e Bietz, 1985,1986; Tattham *et al.*, 1984; Purcell *et al.*, 1988; Dachkevitch e Autran, 1989; MacRitchie *et al.*, 1991; Cornec *et al.*, 1994; Belton *et al.*, 1994, Shewry *et al.*, 1992; Hargreaves *et al.*, 1995b; Gil *et al.*, 1997a,b; Alberti *et al.*, 2000; Alberti, 2000), macromolecular (Kasarda *et al.*, 1976; Graveland *et al.*, 1982; Belitz *et al.*, 1986; MacRitchie, 1987; Cornec *et al.*, 1994; Popineau *et al.*, 1994; Khatkar *et al.*, 1995; Shewry *et al.*, 1995b; Lásztity, 1996; Janssen *et al.*, 1996a; Weegels *et al.*, 1996), microscópico (Belitz *et al.*, 1986; Lindsay e Skerrit, 1999) e macroscópico (Bloksma, 1990; Kovacs *et al.*, 1994; Schroop e Wieser, 1996; Czuchajowska *et al.*, 1996; Uthayakumaran *et al.*, 1999).

Estudos de fraccionamento e reconstituição têm sido bastante importantes para a identificação dos componentes do glúten responsáveis pela sua diferente funcionalidade em diferentes variedades de trigo (Finney e Barmore, 1948; Orth e Bushuk, 1972; MacRitchie, 1985,1987; Chakraborty e Khan, 1988; MacRitchie *et al.*, 1991; Janssen *et al.*, 1996a,b; Uthayakumaran *et al.*, 1999). É actualmente aceite que o comportamento reológico do glúten deriva das propriedades das suas duas fracções proteicas mais

importantes, as gliadinas e as gluteninas, bem como das interações existentes entre estas fracções. A viscosidade está geralmente associada às gliadinas e resulta, provavelmente, de interações proteína-proteína não covalentes, tais como pontes de hidrogénio e interações hidrofóbicas. Por sua vez, a elasticidade está relacionada com as gluteninas e resulta, possivelmente, de interações inter-proteicas covalentes, tais como pontes S-S, e de interações não covalentes (pontes de hidrogénio, interações hidrofóbicas e electrostáticas) (Bloksma, 1975; Tao *et al.*, 1992; Schofield, 1994; Khatkar *et al.*, 1995; Shewry e Tatham, 1997). Embora na prática esta relação seja bem aceite, ao nível molecular o mecanismo responsável pelo carácter viscoelástico do glúten ainda não é totalmente conhecido.

As propriedades viscoelásticas do glúten têm sido estudadas através de diversos métodos reológicos. A monitorização dos factores que influenciam a qualidade (i.e. resistência à deformação, extensibilidade) do glúten tem sido acompanhada através de aparelhos de reologia empírica (Irvine *et al.*, 1961; MacRitchie, 1984, 1987; Kovacs *et al.*, 1994; Czuchajowska *et al.*, 1996; Schropp e Wieser, 1996). No sentido de melhor compreender o comportamento reológico do glúten em termos da sua estrutura física e química, têm sido realizados ensaios de reologia fundamental por vários investigadores. Estudos de oscilação dinâmica a baixa amplitude de deformação têm sido realizados em amostras hidratadas de glúten na tentativa de, por exemplo, compreender a importância de interações não-covalentes e dos grupos sulfidrilo e ligações dissulfeto (Attenburrow *et al.*, 1990; Dreese *et al.*, 1988b, Lefebvre *et al.*, 1994) na estrutura do glúten, investigar o efeito da razão gliadinas/gluteninas (Eliasson e Lundh, 1989; Khatkar *et al.*, 1995; Janssen *et al.*, 1996b; Tsiami *et al.*, 1997; Uthayakumaran *et al.*, 1999) e do grau de hidratação (Janssen *et al.*, 1996a) no comportamento reológico do glúten, e investigar o efeito da temperatura (Schofield *et al.*, 1983; Dreese *et al.*, 1988a; Weegels *et al.*, 1994) nas propriedades dinâmicas e reológicas do glúten.

A elasticidade do glúten tem sido atribuída essencialmente às unidades de elevada massa molecular (HMW) das gluteninas (Huebner e Wall, 1976; Field *et al.*, 1983; MacRitchie, 1987; Popineau *et al.*, 1994a; Jansen *et al.*, 1996a,b; Belton *et al.*, 1995; Belton, 1999; Sapirstein e Fu, 2000; Lásztity *et al.*, 2000). Vários estudos têm sido conduzidos de modo

a compreender a estrutura e as propriedades das gluteninas HMW. A estrutura molecular destas unidades proteicas tem sido estudada por várias técnicas espectroscópicas tais como dicroísmo circular (Kasarda *et al.*, 1976; Tatham e Shewry, 1985; Field *et al.*, 1986; Tatham *et al.*, 1987), espectroscopia de infravermelho (FT-IR) (Purcell *et al.*, 1988; Popineau *et al.*, 1994a) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (Belton *et al.*, 1994; Ablett *et al.*, 1998; Alberti *et al.*, 2000; Alberti, 2000; Gil *et al.*, 2001). A espectroscopia de RMN de sólidos, em particular, tem demonstrado ser uma técnica bastante refinada no estudo de proteínas de cereais no estado sólido (Tatham *et al.*, 1985b, Belton e Gil, 1994; Belton *et al.*, 1994; Gil *et al.*, 1997a,b; Alberti *et al.*, 2000; Alberti, 2000). Adicionalmente à análise estrutural de proteínas, a espectroscopia de RMN de sólidos permite o estudo de processos de relaxação molecular, os quais fornecem informação sobre a mobilidade de moléculas e/ou de grupos funcionais, contribuindo assim para o conhecimento da dinâmica molecular que está na base do mecanismo da elasticidade do glúten. Recentemente, estudos de RMN de ^1H -MAS, HR-MAS e ^{13}C permitiram obter informação valiosa sobre a conformação de unidades de glutenina HMW (Alberti, 2000; Alberti *et al.*, 2000). Estudos sobre o efeito da temperatura em amostras hidratadas de glúten foram igualmente conduzidos através de espectroscopia de RMN de ^1H (Alberti, 2000), possibilitando acompanhar alterações ocorridas ao nível molecular durante o tratamento térmico.

Dada a complexidade inerente à estrutura do glúten, a conjugação de estudos de reologia fundamental com outras técnicas de análise tem suscitado um grande interesse para a caracterização estrutural e dinâmica destes sistemas. Recentemente, resultados preliminares efectuados por outros autores (Callaghan e Gil, 1999, 2000; Gil *et al.*, 2001; Lukaschek *et al.*, 2002, Badiger *et al.*, 2002) demonstraram a potencialidade da combinação da informação obtida ao nível molecular através da espectroscopia de RMN, com as propriedades dinâmicas obtidas por reologia.

Neste capítulo é feito um estudo comparativo dos glúten extraídos das duas variedades de farinha *Amazonas* e *Sorraia*, procurando estabelecer uma relação entre os resultados obtidos por ensaios de reologia fundamental e os resultados obtidos por espectroscopia de RMN, numa tentativa de compreender a origem da diferente funcionalidade dos dois

glúten. A caracterização do comportamento reológico foi efectuada em amostras de glúten hidratadas através de ensaios de oscilação dinâmica a baixa amplitude de deformação. Ensaio de varrimento de frequência e de varrimento de temperatura foram conduzidos de modo a estudar o comportamento mecânico bem como o efeito do tratamento térmico no comportamento reológico das amostras de glúten. Ao nível espectroscópico, foram realizados ensaios de espectroscopia de RMN de ^{13}C e de ^1H com o objectivo de estudar o diferente comportamento das amostras de glúten quando sujeitas à hidratação e a condições de aquecimento/arrefecimento.

IV. 2. Materiais e Métodos

IV. 2.1. Glúten

As amostras de glúten utilizadas neste estudo foram obtidas a partir do fraccionamento das farinhas *Amazonas* (AMA) e *Sorraia* (SOR), tal como descrito em § II.2.1.1.

IV. 2.1.1. Preparação das amostras

As amostras de gluten foram hidratadas a 50% (m/m) com água desionizada, para os ensaios reológicos, ou com água deuterada (D_2O), para os ensaios de RMN, tendo em conta o teor de humidades dessas amostras, de acordo com os dois métodos previamente descritos para preparação das massas de farinha: O método de massa desenvolvida (método 1) e o método de massa não desenvolvida (método 2).

IV. 2.2. Caracterização reológica dos sistemas de glúten

O estudo do comportamento reológico dos sistemas de glúten foi realizado num reómetro de tensão controlada (AR-1000, TA Instruments, New Castle, DE) equipado com uma geometria placas paralelas (2 cm diâmetro e distância de separação de 1,7 mm). De modo a prevenir o deslizamento da amostra, utilizaram-se círculos de lixa fina de 2 cm de diâmetro que foram colados na placa superior da geometria. As perdas de água por evaporação

foram minimizadas protegendo as margens de amostra mais expostas com um óleo mineral de baixa viscosidade ($d=0.84$ g/mL, Sigma-Aldrich Química SA, Sintra, Portugal).

Depois de colocada no reómetro, a amostra ficou em repouso durante 60 min antes de se iniciar qualquer tipo de teste, permitindo, assim, uma uniformização das condições para todas as amostras.

A caracterização reológica das amostras de glúten foi efectuada através de ensaios dinâmicos a baixa amplitude de deformação, a uma amplitude de deformação de 1%, na zona de comportamento viscoelástico linear, tal como definido mais à frente (§ IV.3.1.1). No sentido de comparar as amostras de glúten das duas variedades e estudar o efeito do aquecimento/arrefecimento no comportamento viscoelástico, realizaram-se ensaios de varrimento de frequência antes e depois do tratamento térmico, a uma temperatura constante de 20°C. O comportamento dos sistemas durante o aquecimento e arrefecimento foi estudado através de ensaios de varrimento de temperatura numa gama de 20-80-20°C, a uma taxa de 2 °C/min e a uma frequência constante de 0,5 Hz. Antes do passo de arrefecimento, as amostras ficaram à temperatura de 80°C durante 10 minutos, durante os quais se realizou um ensaio de varrimento no tempo. A temperatura foi controlada com uma precisão de $\pm 0,1$ °C através do sistema Peltier localizado no prato inferior do sistema de medida do reómetro.

IV. 2.3. Caracterização por espectroscopia de RMN das amostras de glúten

As amostras de glúten foram caracterizadas por espectroscopia de ressonância magnética, tendo-se registados espectros de carbono (^{13}C -CP/MAS) e de protão (^1H -MAS).

Os espectros de ^{13}C -CP/MAS e de ^1H -MAS foram obtidos num espectrómetro Bruker DRX 4000, operando a uma frequência de campo B_0 de 100.6 MHz para o carbono e 400 MHz para o protão, utilizando uma sonda Bruker de polarização cruzada e com rotação segundo o ângulo mágico (CPMAS) de 4 mm. As amostras foram colocadas num rotor de 4 mm tapado com uma tampa de cerâmica, possibilitando assim a realização de ensaios a temperaturas mais elevadas, i.e., até 95°C. O rotor foi pesado antes e depois da aquisição por RMN para verificar a possibilidade de perdas de água por evaporação. A variação de massa foi nula ou praticamente desprezável ($\pm 0,001$ g).

As condições de aquisição dos espectros de ^{13}C -CP/MAS, ^{13}C -SPE e ^1H -MAS foram aquelas definidas anteriormente para as amostras de farinha (ver § III.2.4).

Os tempos de relaxação T_{1H} foram obtidos usando a sequência “inversão-recuperação” ($180^\circ_x - \tau - 90^\circ_x$). Utilizaram-se 12 a 14 valores de tempos de intervalo entre pulsos, numa gama de 0,001-15 s, e a uma velocidade de rotação de 5 kHz. Os valores de T_{1H} foram calculados por ajuste exponencial das intensidades $I(\tau)$ dos picos do espectro registadas versus o tempo de intervalo entre pulsos (τ), de acordo com a equação 1.34 (ver § I.2.2.3.2).

Os tempos de relaxação T_{2H} foram obtidos usando a sequência de pulsos Carr-Purcell-Meiboom-Gill ($90^\circ_x - \tau - 180^\circ_y$). Utilizaram-se 15 a 20 valores de tempos de intervalo entre pulsos, numa gama de 0,05-15 ms, e a uma velocidade de rotação de 5 kHz. Os valores de intensidade, $I(\tau)$, de cada pico foram representados graficamente em função do tempo de intervalo entre pulsos (τ). O comportamento de relaxação foi descrito por uma das exponenciais representadas pelas equações 3.1 e 3.2 (ver § III.2.4)

Os ensaios de temperatura foram realizados para temperaturas na gama 20-80-20°C e 20-95-20°C. A temperatura foi controlada utilizando uma unidade de aquecimento VT (B-VT Bruker 2000), com uma variação de ± 0.2 °C. As amostras foram aquecidas directamente dentro da sonda e permaneceram no mínimo 15 min a cada temperatura, antes da aquisição, para atingir o equilíbrio térmico.

IV. 3. Resultados e Discussão

IV. 3.1. Caracterização reológica das amostras de glúten das variedades Amazonas e Sorraia

IV. 3.1.1. Identificação da zona de comportamento viscoelástico linear

À semelhança do realizado para as amostras de farinha, a caracterização reológica das amostras de glúten hidratadas iniciou-se pela definição da zona de comportamento

viscoelástico linear, ou seja, a zona na qual o comportamento reológico do sistema é independente da deformação imposta. A definição da zona de comportamento viscoelástico linear foi efectuada com base em ensaios de varrimento de tensão sinusoidal aplicada, testando-se a sensibilidade da resposta à deformação resultante. A Figura 4.1 apresenta exemplos das curvas de varrimento de tensão sinusoidal aplicada para amostras de glúten das variedades AMA e SOR.

Considerando o valor de amplitude de deformação limite como o valor correspondente a 95% do valor inicial do módulo, verifica-se que ambas as amostras de glúten apresentaram uma zona de comportamento viscoelástico linear bastante alargada, registando-se valores de deformação limite de 13 % e 17 %, respectivamente para as amostras de glúten SOR e glúten AMA, após preparação. Após o tratamento térmico (aquecimento até 80°C seguido de arrefecimento até 20°C), registaram-se limites de linearidade semelhantes, como ilustrado na Figura 4.1 para o glúten AMA.

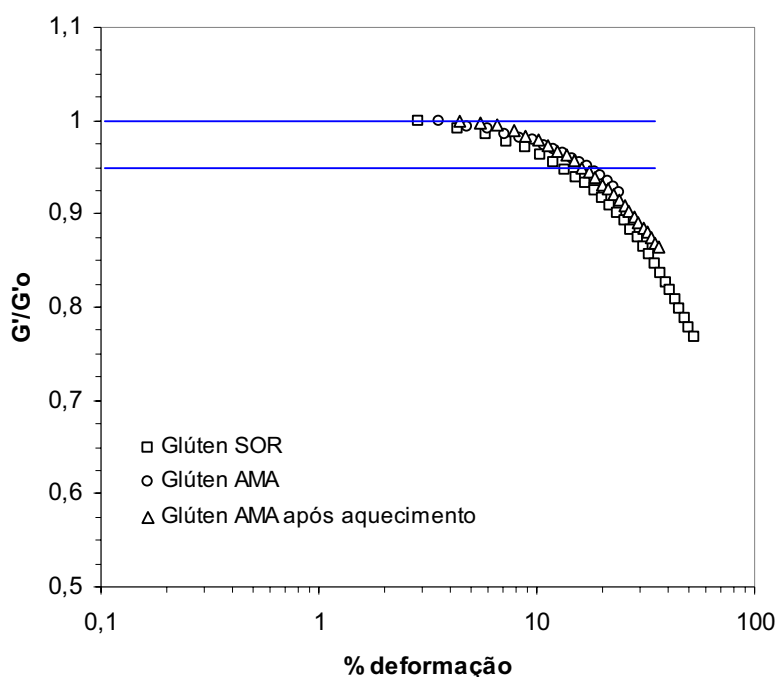


Figura 4.1 - Valores de módulo de conservação relativo (G'/G'_0) em função da amplitude de deformação imposta (γ , %), para amostras de glúten Amazonas (AMA) e Sorraia (SOR), ensaiadas após preparação e após aquecimento/arrefecimento no reómetro (20-80-20°C). G'_0 corresponde ao valor do módulo inicial, para os mais baixos valores de deformação ensaiados.

Os valores limite de comportamento viscoelástico linear determinados para o glúten foram bastante mais elevados do que os registados para as amostras de farinha ($\gamma < 0,1\%$). Valores limite da ordem dos 2-15% de amplitude de deformação foram referidos por outros autores (Lefebvre *et al.*, 1994; Khatkar *et al.*, 1995; Wang e Kokini, 1995; Uthayakumaran *et al.*, 2000) para amostras de glúten.

Apesar da alargada gama de deformações correspondentes ao comportamento viscoelástico linear, optou-se por efectuar os ensaios a uma baixa amplitude de deformação de 1 %.

IV. 3.1.2. Comparação das amostras de glúten das variedades Amazonas e Sorraia hidratadas à temperatura ambiente

No sentido de comparar o comportamento reológico das amostras de glúten provenientes de cada uma das variedades, realizaram-se ensaios de varrimento de frequência, permitindo deste modo monitorizar as propriedades mecânicas dos glúten após hidratação. A Figura 4.2 apresenta os espectros mecânicos (variação de G' e G'' com a frequência) e a variação de $\tan \delta$ com a frequência de oscilação, para as amostras de glúten das variedades AMA e SOR, hidratadas a 50% (m/m), preparadas pelo método 1. A Figura 4.3 apresenta o mesmo tipo de resultados obtidos para amostras de glúten preparadas pelo método 2.

Antes do tratamento térmico, os glúten AMA e SOR apresentaram um comportamento viscoelástico semelhante e concordante com o observado anteriormente por outros autores (Dreese *et al.*, 1988a,b; Cornec *et al.*, 1994; Hargreaves *et al.*, 1995b; Janssen *et al.*, 1996b), mas com algumas diferenças que merecem realce. $\tan \delta$ aumentou com a frequência, o que indica que, para a mesma gama de frequências analisadas, o módulo G'' aumentou mais do que o módulo G' . Este aumento implica que o glúten hidratado exibe um comportamento mais viscoso, no sentido em que a dissipação de energia é mais elevada, para frequências mais elevadas. Porém, mesmo para as frequências mais elevadas, os glúten apresentaram uma resposta essencialmente elástica, dado que os valores de $\tan \delta$ foram todos inferiores a 1 (i.e. $G' > G''$).

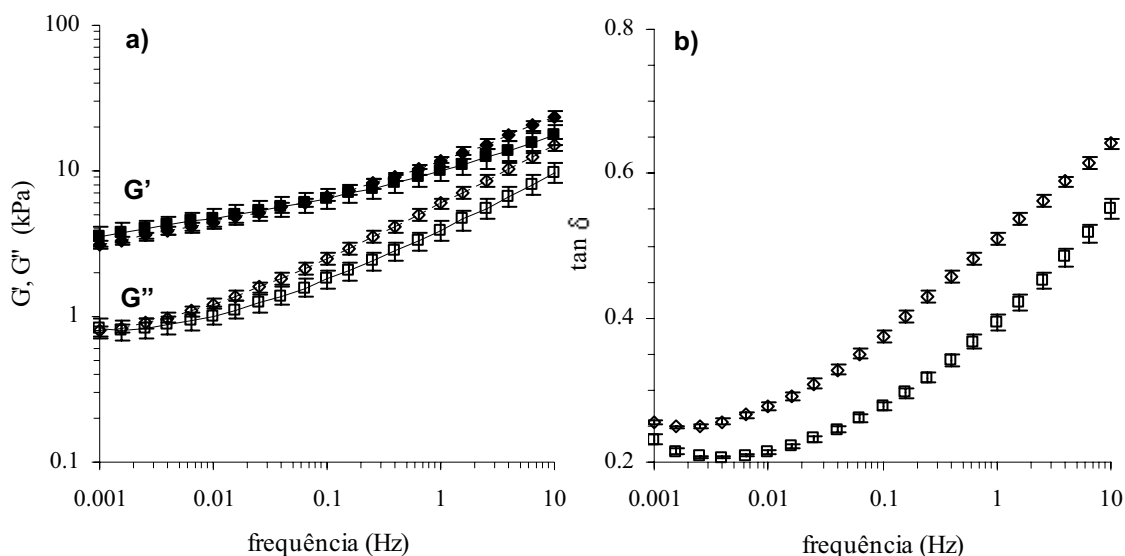


Figura 4.2 - Comportamento viscoelástico dos glútenos Amazonas (,) e Sorraia (, \diamond) a 50% (m/m) de hidratação ($\gamma=1\%$, 20°C), preparados de acordo com o método 1. a) - Variação dos módulos viscoelásticos (G' e G''), e b) - variação da tangente ao ângulo de perda, $\tan \delta$, com a frequência de oscilação (ω).

O método de preparação das amostras apresenta um claro efeito sobre as propriedades viscoelásticas do glúten hidratado. A observação de uma menor dependência dos módulos viscoelásticos face à frequência de oscilação, a maior diferença entre eles (especialmente a baixas frequências) e a tendência para o “plateau” elástico, para as amostras preparadas pelo método 1 reflecte o efeito do trabalho mecânico (mistura) imposto ao sistema, contribuindo para o estabelecimento de mais interações intermoleculares responsáveis por uma menor mobilidade macromolecular na escala de tempo analisada.

As amostras de glúten da variedade SOR apresentaram valores do módulo de conservação (G') ligeiramente superiores ao glúten da variedade AMA (Figura 4.3), traduzindo a formação de uma rede macromolecular ligeiramente mais densa. No entanto, o glúten SOR apresentou uma maior dependência do módulo G' relativamente à frequência de oscilação e valores de $\tan \delta$ mais elevados, reflectindo uma maior mobilidade macromolecular nesta

rede. Estas diferenças diminuíram quando as amostras de glúten foram sujeitas a trabalho mecânico (Figura 4.2). A principal diferença entre o comportamento viscoelástico dos glúten das duas variedades é observado no traçado de $\tan \delta$ em função da frequência, tendo o glúten AMA apresentado um carácter elástico claramente mais acentuado.

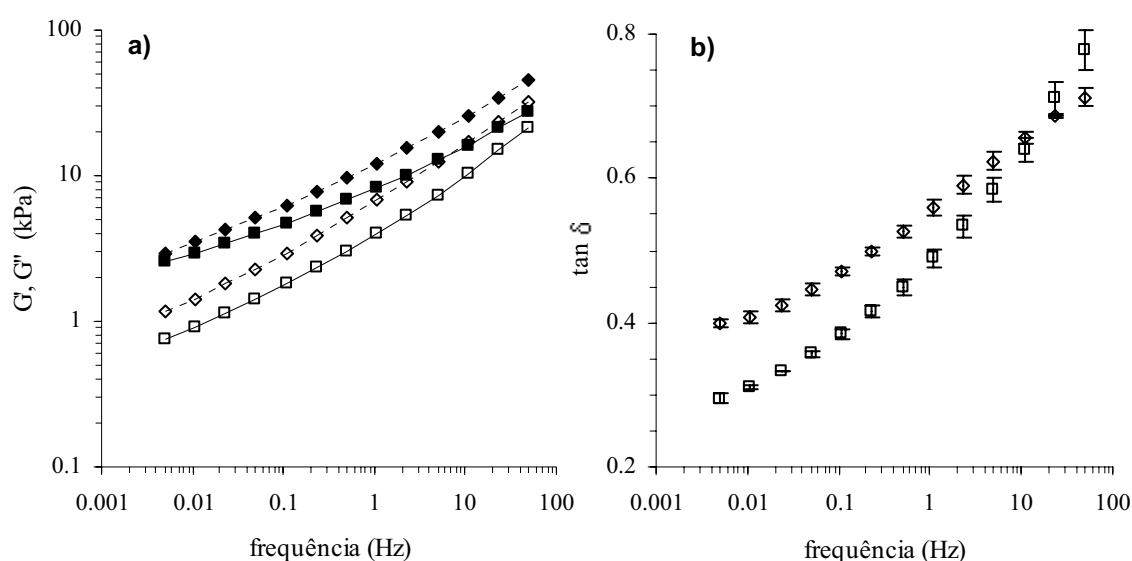


Figura 4.3 - Comportamento viscoelástico dos glúten Amazonas (,) e Sorraia (, \diamond) a 50% (m/m) de hidratação ($\gamma=1\%$, 20°C), preparados de acordo com o método 2. a) - Variação dos módulos viscoelásticos (G' e G''), e b) - variação da tangente ao ângulo de perda, $\tan \delta$, com a frequência de oscilação (ω). Os resultados apresentados correspondem a curvas médias obtidas em três ensaios. As barras de erro apresentadas correspondem aos valores de desvio padrão obtidos.

O diferente comportamento viscoelástico apresentado pelas duas variedades de glúten poderá estar relacionado com a sua composição em termos das suas fracções proteicas constituintes, i.e. as gliadinas e as gluteninas. A variação da quantidade e da qualidade destas proteínas poderá reflectir-se num glúten com propriedades bastante distintas. A razão gliadinas/gluteninas tem sido apontada como um factor importante para a definição das propriedades reológicas das massas de pão (Belitz *et al.*, 1986; MacRitchie, 1987; Khatkar *et al.*, 1995; Sapirstein e Fu, 2000). Uma menor razão (maior quantidade relativa

de gluteninas) está directamente relacionada com um glúten com maior força e maior elasticidade e, portanto, com valores de G' mais elevados. As gliadinas podem ser vistas como “solventes” das gluteninas, actuando como agentes plasticizantes (Belitz *et al.*, 1986; Cornec *et al.*, 1994; Khatkar *et al.*, 1995). Um aumento da quantidade de “solvente” deverá enfraquecer as propriedades elásticas do glúten pela diminuição da densidade de zonas de interacção intermolecular, contribuindo para o aumento do carácter viscoso, ou por outras palavras, diminuição do carácter elástico do sistema. Para além da razão entre os teores de gliadinas e gluteninas, a composição das gluteninas parece também ser um factor determinante na manifestação de um glúten com um bom potencial para a panificação. Estudos realizados anteriormente por outros autores indicam que são as subunidades HMW as responsáveis pela formação de um glúten com maior força ou tenacidade (Huebner and Wall, 1976; Tatham *et al.*, 1985a; Belitz *et al.*, 1986; Payne *et al.*, 1987; Eliasson e Lundh, 1989; Lefebvre *et al.*, 1994; Popineau *et al.*, 1994b; Weegels *et al.*, 1996; Lindsay e Skeritt, 1999). A viscoelasticidade das gluteninas baseia-se na interacção transiente de longas concatenações formadas pela associação de subunidades LMW e HMW de gluteninas (Cornec *et al.*, 1994).

De acordo com a análise efectuada em termos da composição das sub-fracções do glúten (resultados não apresentados), ambas as variedades apresentaram teores bastante semelhantes de gliadinas e de gluteninas. A composição em gliadinas foi de $7 \pm 2 \%$ para o glúten da variedade AMA e $6 \pm 1 \%$ para o glúten da variedade SOR. As gluteninas, na sua totalidade (insolúveis + solúveis em ácido), contaram com uma percentagem de $65 \pm 3 \%$ e $60 \pm 3 \%$ para os glúten das variedades AMA e SOR, respectivamente. Estes resultados apontam para uma razão gliadinas/gluteninas bastante semelhante entre as duas variedades, pelo que a razão entre as quantidades relativas das duas fracções proteicas não parece ser justificação para o diferente comportamento das amostras.

A composição das gluteninas, porém, parece ser diferente entre as duas variedades de glúten. A partir da separação electroforética das gluteninas dos glúten das variedades AMA e SOR, efectuada por SDS-PAGE, Brites e Bagulho (1999) determinaram que a composição em gluteninas HMW e LMW é distinta entre as duas variedades. As gluteninas da variedade AMA apresentaram subunidades HMW (5+10) que, de acordo com trabalhos publicados (Branlard e Dradvert, 1985; Payne *et al.*, 1987), proporcionam maior elasticidade ao glúten do que as presentes na variedade SOR (2*+12). Assim, a diferente

composição das gluteninas parece ser uma possível explicação para as diferentes propriedades viscoelásticas apresentadas pelo glúten de cada uma das variedades.

IV. 3.1.3. Comparação das amostras de glúten das variedades Amazonas e Sorraia durante o tratamento térmico

Após a caracterização do comportamento viscoelástico das amostras de glúten hidratado a 20°C (após preparação), realizaram-se ensaios de varrimento de temperatura (2°C/min) para estudar o comportamento viscoelástico das amostras de glúten durante o ciclo de aquecimento/arrefecimento (20-80-20°C). O comportamento observado foi qualitativamente semelhante para amostras preparadas pelo método 1 ou 2. A Figura 4.4 apresenta a variação dos módulos viscoelásticos G' e G'' em função da temperatura, durante o aquecimento entre 20 e 80°C e durante o arrefecimento entre 80 e 20°C, após a amostra ter sido mantida durante 10 min a 80°C, para as amostras de glúten das variedades AMA e SOR.

Durante a fase de aquecimento, ambas as amostras apresentaram um comportamento qualitativamente semelhante. Observou-se uma diminuição dos valores do módulo de G' até cerca de 60°C, seguindo-se depois um ligeiro aumento até 80°C. A diminuição dos valores de G' foi mais acentuada na amostra do glúten da variedade SOR, sugerindo uma maior alteração ao nível estrutural nesta amostra devido ao aquecimento do sistema.

Pensa-se que o efeito da temperatura sobre o comportamento viscoelástico do glúten incide essencialmente sobre a alteração das ligações que participam na formação da estrutura em rede do glúten (Bloksma, 1975; Lefebvre *et al.*, 1994; Hargreaves *et al.*, 1995a). A diminuição dos valores de G' até cerca de 60°C é essencialmente reversível e estará associada ao enfraquecimento de interações intermoleculares, como ligações de hidrogénio entre proteínas, por acção da elevação da temperatura. Acima deste valor de temperatura verifica-se um aumento de G' , ou seja, um fortalecimento da estrutura do sistema, resultante de alterações irreversíveis associadas à desnaturação proteica e ao estabelecimento de novas ligações entre proteínas, incluindo ligações covalentes. O rearranjo de ligações covalentes observado durante o aquecimento foi observado anteriormente por outros autores em amostras de glúten e gluteninas HMW (Schofield *et al.*, 1983; Kokini *et al.*, 1994; Levine e Slade, 1988, 1990, Cuq *et al.*, 2000).

Durante o arrefecimento verifica-se o aumento de G' , sendo este aumento igualmente mais acentuado para o glúten da variedade Sorraia.

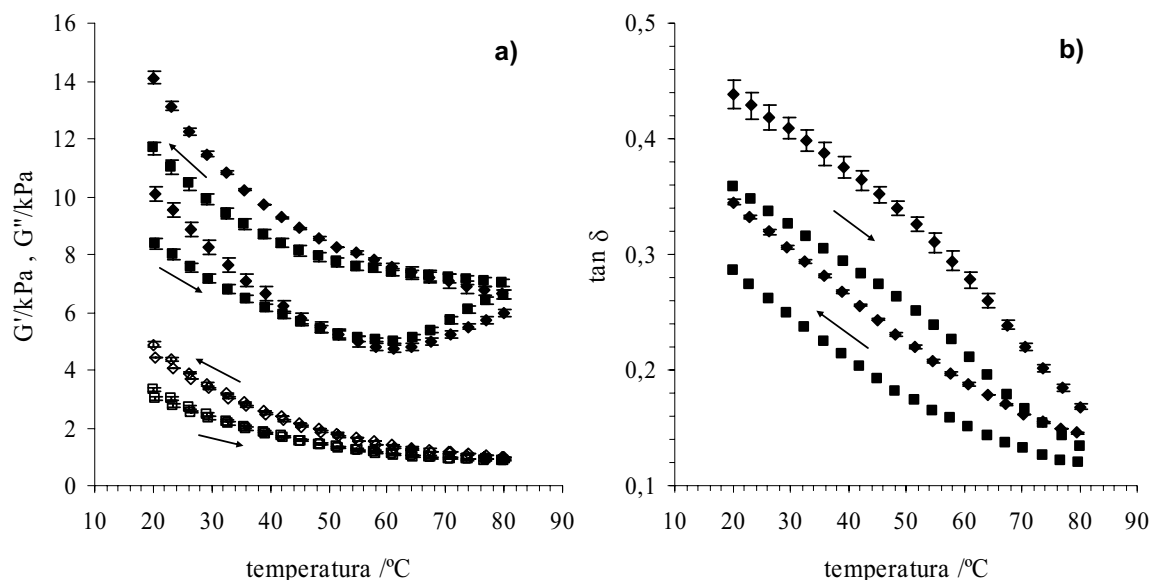


Figura 4.4 - Módulos viscoelásticos (G' e G'') (a) e tangente ao ângulo de perda ($\tan \delta$) (b) em função da temperatura, para glútenes AMA (●) e SOR (◇) a 50% (m/m) de hidratação, preparados de acordo com o método 1 ($\gamma=1\%$, $\omega=0,5$ Hz, 20°C). Símbolos a cheio representam G' e símbolos abertos representam G'' . A amostra foi sujeita “in situ” a aquecimento entre 20 e 80°C ($2^\circ\text{C}/\text{min}$), mantida a esta temperatura durante 10 min, e depois arrefecida até 20°C ($2^\circ\text{C}/\text{min}$). As barras de erro apresentadas exemplificam os valores obtidos de desvio padrão, relativamente a três ensaios.

Contrariamente ao módulo de conservação, o módulo de perda (G'') diminuiu continuamente ao longo do aquecimento, sendo esta diminuição essencialmente reversível, ou seja, após arrefecimento valores de G'' atingidos eram semelhantes aqueles que caracterizavam o sistema antes do aquecimento, tendo as duas variedades apresentado um comportamento qualitativamente semelhante. A variedade SOR apresentou valores de G'' mais elevados no início do aquecimento, mas, após se atingir os 80°C , as duas variedades apresentaram valores de G'' bastante similares. As alterações na estrutura do sistema parecem assim afectar, essencialmente, as interações intermoleculares responsáveis pelo armazenamento de energia durante a solicitação periódica, ou seja, o carácter elástico do sistema.

No que respeita ao efeito da temperatura sobre a tangente ao ângulo de perda (Figura 4.4.b), o comportamento observado resulta, como esperado, do diferente efeito da temperatura sobre os dois módulos viscoelásticos. Ao longo do aquecimento verificou-se uma diminuição de $\tan \delta$ com o aumento da temperatura, diminuição esta ligeiramente mais acentuada acima do valor de temperatura próximo daquele para o qual se verificou o aumento do módulo G' . Durante o período de arrefecimento $\tan \delta$ aumentou com a diminuição da temperatura. Verifica-se, assim, que o carácter elástico do sistema é mais acentuado para temperaturas elevadas.

IV. 3.1.4. Comparação do comportamento viscoelástico das amostras de glúten após o ciclo de aquecimento-arrefecimento

Para o estudo do comportamento viscoelástico das duas amostras de glúten após aquecimento e consequente desnaturação proteica, realizaram-se ensaios de varrimento de frequência a 20 °C, após o ciclo de aquecimento-arrefecimento, cujos espectros estão apresentados na Figura 4.5. Após o tratamento térmico 20-80-20°C, o comportamento viscoelástico foi qualitativamente semelhante ao observado antes do aquecimento mas apresentou algumas diferenças quantitativas importantes: as amostras de glúten de ambas as variedades apresentaram valores de G' mais elevados e valores de $\tan \delta$ mais baixos, traduzindo um fortalecimento da matriz proteica e um aumento do carácter elástico do sistema (Figura 4.5). Contudo, a dependência de ambos os módulos relativamente à frequência de oscilação não sofreu alteração significativa.

Estas alterações estarão associadas à formação de agregados tridimensionais estabilizados por ligações covalentes intermoleculares devido ao aumento da temperatura (Bushuk, 1985). A desnaturação proteica e a formação destes agregados contribuem para o fortalecimento da estrutura do glúten, o que determina o volume e a qualidade da textura final do pão (Schofield *et al.*, 1983).

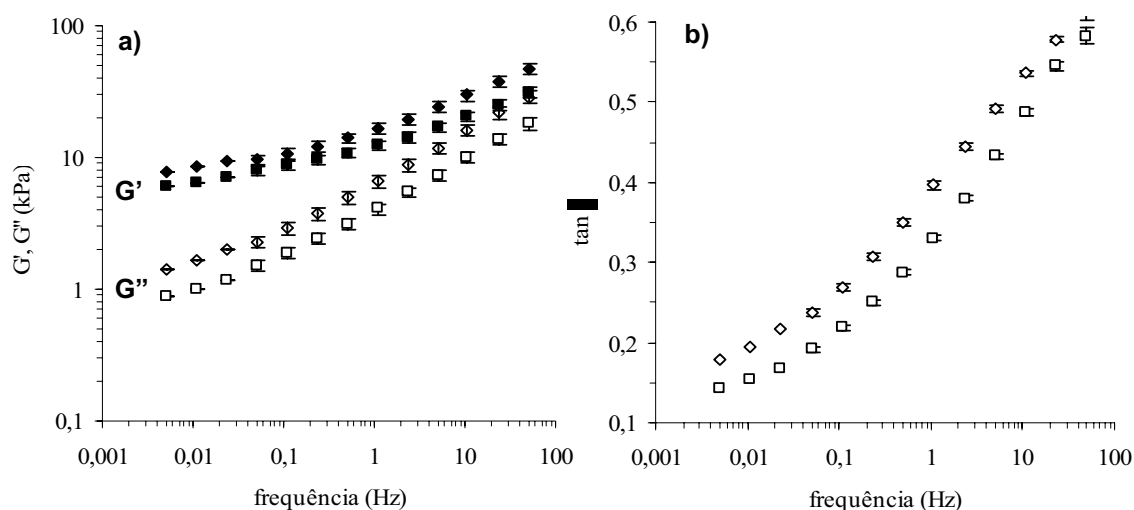


Figura 4.5 - Comportamento viscoelástico ($\gamma=1\%$, 20°C) dos glútenos hidratados Amazonas (□) e Sorraia (◇), preparados de acordo com o método 1 e ensaiados após tratamento térmico 20°C - 80°C (10 min) - 20°C , $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. a) - variação dos módulos viscoelásticos (G' e G''), e b) - variação da tangente ao ângulo de perda, $\tan \delta$, com a frequência de oscilação (ω).

A variedade SOR continuou a apresentar módulos ligeiramente mais elevados e um maior carácter viscoso, indicando uma maior mobilidade da rede de glúten desta variedade.

Convém referir que o perfil viscoelástico dos sistemas após o tratamento térmico poderá ser influenciado pelo contributo da gelatinização de algum amido residual que fica aprisionado na rede de glúten formada durante a sua hidratação. Os resultados da análise química efectuada ao glúten (ver Tabela 2.2, § II.3.3.1) indicam a presença de $6,3 \pm 0,2\%$ de amido no glúten da variedade AMA e $6,9 \pm 0,3\%$ no glúten da variedade SOR. Os espectros de RMN apresentados na secção seguinte confirmam a presença de amido residual.

IV. 3.2. Caracterização das amostras de glúten por RMN de estado sólido

As amostras de glúten foram caracterizadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H do estado sólido. Primeiramente procedeu-se à caracterização por RMN de ^{13}C -CP/MAS, ^{13}C -SPE e ^1H -MAS das amostras de glúten das duas

variedades, no estado seco, na tentativa de determinar aspectos diferenciadores entre o glúten das duas variedades. Seguidamente as amostras foram hidratadas a 50% (m/m) com D₂O e submetidas a um tratamento térmico (20-80-20°C), estudando-se assim o efeito da hidratação e da temperatura nas amostras de glúten, através da aquisição de espectros de ¹³C-CP/MAS, ¹³C-SPE e ¹H-MAS. Nesta secção faz-se primeiro a discussão dos resultados relativamente às amostras preparadas pelo método 2. Posteriormente, é feita a comparação dos resultados obtidos para as amostras preparadas pelo método 1, analisando-se o efeito do método de preparação das amostras nos resultados obtidos.

IV. 3.2.1. Caracterização por espectroscopia de ¹³C-CP/MAS e ¹³C-SPE

IV. 3.2.1.1. Efeito da hidratação

Os espectros de ¹³C-CP/MAS das amostras de glúten das variedades AMA e SOR no estado seco e hidratado (50% m/m D₂O) estão apresentados na Figura 4.6.

No estado seco (Figura 4.6, espectros a e c), as amostras de glúten das duas variedades AMA e SOR apresentaram espectros de ¹³C-CP/MAS com um perfil bastante semelhante entre si. Ambas as variedades apresentaram os sinais característicos de uma matriz essencialmente proteica, reflectindo a presença dos aminoácidos mais abundantes (glutamina, glicina e prolina) e dos aminoácidos menos abundantes (serina, tirosina, leucina, alanina e treonina) constituintes do glúten. As atribuições dos sinais de ressonância estão apresentadas na Tabela 4.1 e foram baseadas em trabalhos publicados anteriormente (Gil *et al*, 1997a,b; Alberti, 2000).

Na região de 0-30 ppm observa-se a ressonância dos carbonos das cadeias alifáticas da maioria dos aminoácidos, seguindo-se a região das ressonâncias alfa dos resíduos de tirosina e leucina (38 ppm), glutamina (52 ppm) e prolina (59 ppm). A 114 ppm, 127 ppm, e 155 ppm observa-se a ressonância dos carbonos aromáticos dos resíduos de tirosina e fenilalanina. A ressonância a 114 ppm encontra-se sobreposta com uma banda lateral de rotação indicada na figura com o símbolo *.

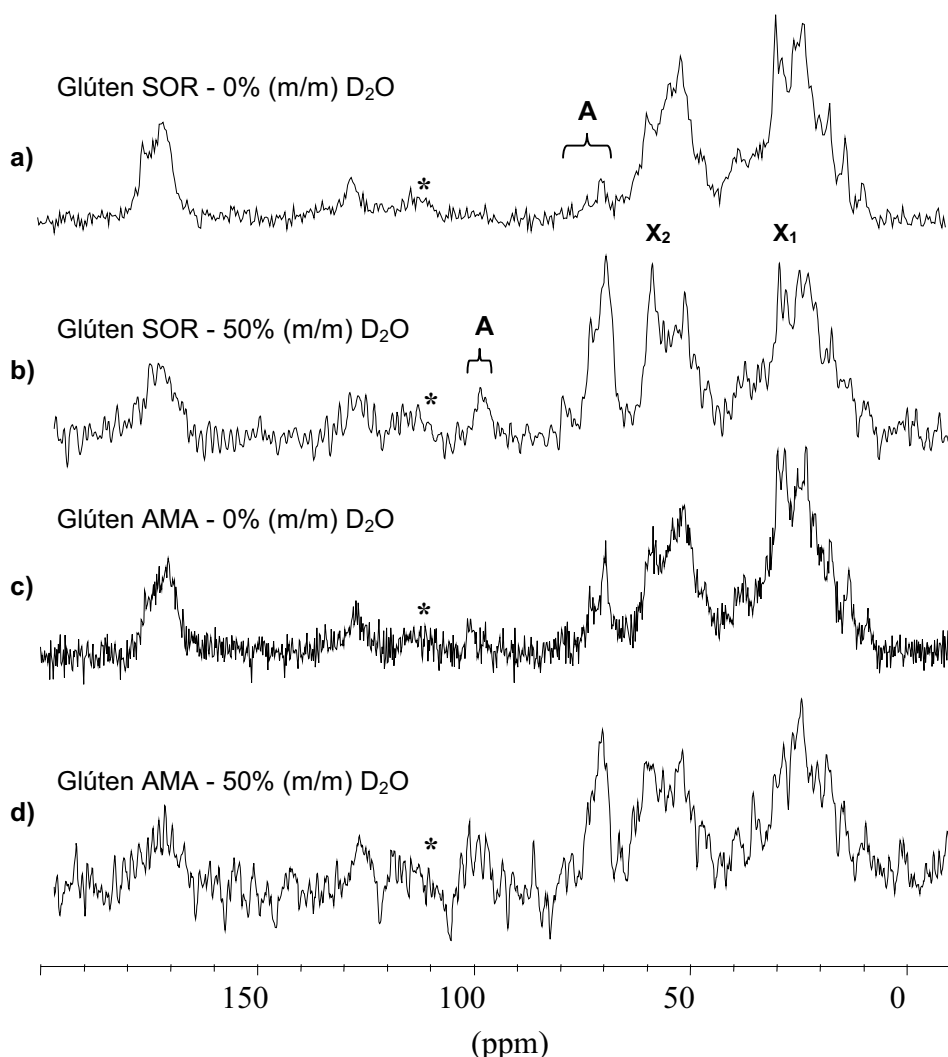


Figura 4.6 - Espectros ^{13}C /CPMAS de amostras de glúten extraídas das farinhas das variedades *Amazonas* (AMA) e *Sorraia* (SOR), 6 kHz; a)- Glúten SOR seco (0% D_2O), ns=1704 ; b)- Glúten SOR hidratado (50% D_2O), ns= 500; c)- Glúten AMA seco (0% D_2O), ns= 660; d)- Glúten AMA hidratado (50% D_2O), ns=50; * - bandas laterais de rotação; A - amido; x1, x2 - sinais diferenciadores das duas variedades de glúten no estado hidratado (ver texto/discussão)

A 170-175 ppm surge a ressonância dos carbonos dos grupos carbonilo das cadeias hidrocarbonadas das proteínas. A 47 ppm observa-se ainda um sinal sob a forma de um ombro atribuído aos carbonos na posição delta do anel dos resíduos de prolina. Em ambas as amostras de glúten observa-se ainda a presença de algum amido residual tal como é deduzido pelas ressonâncias manifestadas a cerca de 70 ppm e 100 ppm.

Tabela 4.1 - Atribuições dos sinais dos espectros de RMN de ^{13}C do estado sólido das amostras de glúten, com base em estudos prévios (Gil *et al*, 1997a,b; Alberti, 2000)

δ (ppm)	Atribuição	
	Tipo de carbono	Componente
9,4	$-(\text{CH}_2)_n- / -\text{CH}_3$	leucina, treonina, alanina, prolina, glutamina, lípidos
13,7	$-(\text{CH}_2)_n- / -\text{CH}_3$	leucina, treonina, alanina, prolina, glutamina, lípidos
17,3	$-(\text{CH}_2)_n- / -\text{CH}_3$	leucina, treonina, alanina, prolina, glutamina, lípidos
23,1	$-\text{CH} / -(\text{CH}_2)_n-$	prolina (cadeia lateral), lípidos
28,2	$-(\text{CH}_2)_n-$	glutamina (cadeia lateral), lípidos
29,8	$-(\text{CH}_2)_n-$	prolina e glutamina (cadeia lateral), lípidos
38,4	$-(\text{CH}_2)_n-$	tirosina e leucina
52,7	$-\text{CH}$	glutamina, leucina e alanina (cadeia central)
54,0	$-\text{CH}$	glutamina, leucina e alanina (cadeia central)
59,5	$-\text{CH}$	prolina, treonina e serina (cadeia central)
70,1	$-\text{CHOH}-$	amido
73,2	$-\text{CH}_2-$	treonina
99,8	$-\text{CH}-$	amido
113,9	$-\text{CH}-$	tirosina
127,6	$-\text{CH}-$	tirosina, lípidos
155,3	$-\text{CH}-$	tirosina
171,5	$-\text{COO}-$	Grupos carbonilo, lípidos
172,6	$-\text{COO}-$	Grupos carbonilo, lípidos
175,8	$-\text{COO}-$	Grupos carbonilo das cadeias laterais: glutamina

A hidratação das amostras conduziu a alterações significativas nos espectros de ^{13}C -CP/MAS, tal como se pode verificar na Figura 4.6, espectros b e d. Para ambas as variedades, a hidratação conduziu à diminuição da razão sinal/ruído, o que reflecte um aumento da mobilidade em todo o sistema. A hidratação produziu ainda a alteração da conformação das bandas dos carbonos alifáticos (0-30 ppm), carbonos alfa (53-60 ppm) e

carbonos dos grupos carbonilo (171-176 ppm). Os sinais do amido a 70 ppm e a 100 ppm tornaram-se mais evidentes, observando-se ainda o aparecimento de duas novas ressonâncias a 75 ppm e a 81 ppm. Este efeito poderá estar relacionado com o grande aumento de mobilidade da matriz proteica (diminuição da intensidade dos sinais) em relação ao amido, pelo que, em termos relativos, o amido apresentou sinais com uma maior intensidade relativamente aos sinais de proteína.

Embora nos espectros de ^{13}C -CP/MAS das amostras de glúten seco (Figura 4.6a, c) não se tenha evidenciado qualquer diferenciação entre os glúten das duas variedades, nos espectros das amostras hidratadas, porém, alguns sinais parecem diferenciar as duas variedades. Verifica-se que os espectros de cada variedade no estado hidratado (Figura 4.6b,d) diferem essencialmente na intensidade dos sinais a 29,8 ppm e a 59,5 ppm, indicados na figura com os símbolos \times_1 e \times_2 , respectivamente. Estas ressonâncias são atribuídas aos carbonos alifáticos dos resíduos de glutamina e prolina, e aos carbonos alfa dos resíduos de prolina e tirosina, respectivamente. No glúten da variedade AMA, estes sinais apresentam uma menor intensidade comparativamente ao glúten da variedade SOR. Uma diminuição da intensidade de um sinal é uma indicação de uma diminuição da rigidez. Estes resultados parecem indicar que alguns resíduos de glutamina e prolina ficam mais mobilizados por efeito de hidratação no glúten da variedade AMA e mais rígidos no glúten da variedade SOR, factor este que poderá estar na base dos valores de G' ligeiramente mais elevados, observados para a variedade SOR nos ensaios de reologia.

A Figura 4.7 apresenta os espectros de ^{13}C -SPE das amostras de glúten das variedades AMA e SOR hidratadas a 50% (m/m), adquiridos com um tempo de intervalo entre scans de 5s. A técnica de ^{13}C -SPE, usada com tempo de contacto entre scans adequados, selecciona os carbonos mais móveis (com menores valores de T_{1H}).

Os espectros de ^{13}C -SPE apresentam os sinais mais intensos a 10-33 ppm (carbonos alifáticos) e a 175-179 ppm (carbonos $\text{C}=\text{O}$), revelando a maior mobilidade destes carbonos relativamente aos carbonos alfa (50-65 ppm) e carbonos aromáticos (117 ppm, 130 ppm, 138 ppm). As ressonâncias na região de 10-33 ppm (carbonos alifáticos), 128-130 ppm (carbonos $\text{C}=\text{C}$) e a 170 ppm (carbonos $\text{C}=\text{O}$) poderão ainda revelar a presença de lípidos residuais, componentes estes caracterizados por uma elevada mobilidade. A

sobreposição destes sinais com os sinais de proteína poderá dissimular a contribuição dos lípidos nos espectros de ^{13}C -SPE. Porém, a presença de lípidos residuais nas amostras de glúten é confirmada com o aparecimento de sinais característicos dos lípidos nos espectros de ^1H -MAS, tal como será discutido na secção IV.3.2.2.1.

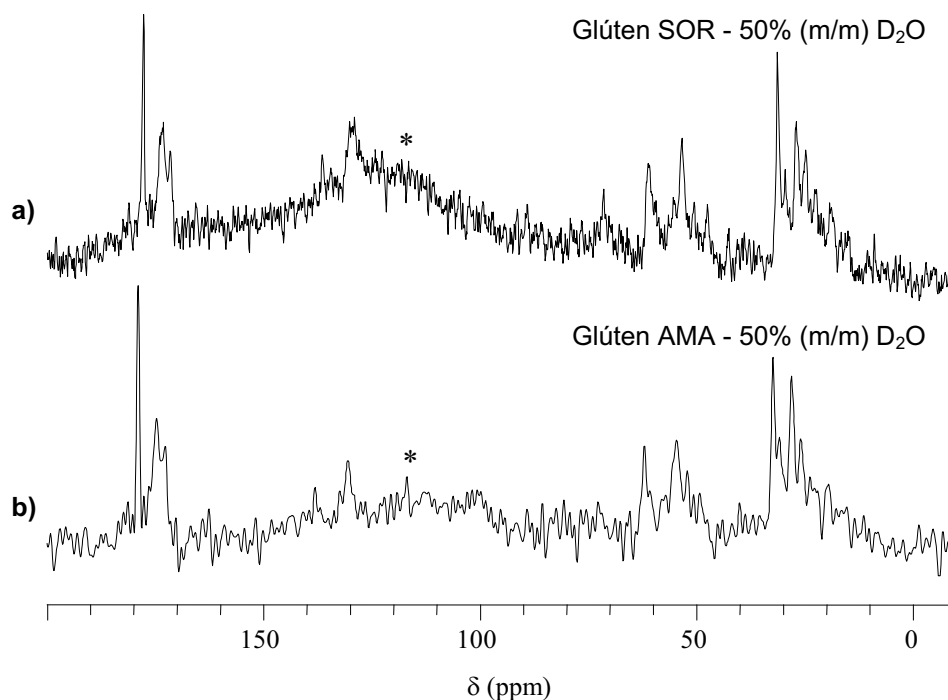


Figura 4.7 - Espectros ^{13}C - SPE amostras de glúten hidratado (50% D_2O m/m), 6 kHz; a)- glúten SOR, ns=188; b)- glúten AMA, ns=64. * - bandas laterais de rotação.

IV. 3.2.1.2. Efeito do tratamento térmico

O efeito da temperatura nos sistemas de glúten foi estudado *in situ* em amostras de glúten hidratadas a 50% (m/m). É de esperar que o aquecimento das amostras de glúten provoque uma alteração da conformação das proteínas, normalmente traduzida pelo conceito de desnaturação proteica. No sentido de avaliar o efeito do tratamento térmico no glúten, as amostras de glúten de ambas as variedades foram aquecidas de 20°C até 80°C e posteriormente arrefecidas novamente até 20°C. Para o glúten da variedade SOR testou-se ainda o aquecimento até à temperatura máxima de 95°C, numa tentativa de se conseguir identificar alguma alteração mais evidente devido ao aquecimento das amostras até uma temperatura mais elevada. A Figura 4.8 apresenta os espectros adquiridos antes e depois do

ciclo de aquecimento/arrefecimento, para as amostras de glúten das duas variedades, AMA e SOR. No sentido de facilitar a comparação dos espectros obtidos antes e depois do tratamento térmico, na Figura 4.8a,d são apresentados novamente os espectros das amostras de glúten hidratadas, já discutidos e apresentados na Figura 4.6 b, d.

O aquecimento dos sistemas de glúten de 20°C até 80°C e posterior arrefecimento novamente até 20°C provocou algumas alterações nos espectros de ^{13}C -CP/MAS, tal como se pode observar na Figura 4.8b, e. Após tratamento térmico, a razão sinal/ruído dos espectros aumentou como resultado do aumento da rigidez dos sistemas. A resolução dos espectros aumentou também após o tratamento térmico, o que indica uma maior organização molecular.

Mais especificamente, após o ciclo de aquecimento/arrefecimento (20-80-20°C) verifica-se a alteração da configuração das bandas dos carbonos alifáticos (0-30 ppm), dos carbonos alfa (50-70 ppm) e dos carbonos carbonílicos (170-176 ppm), o que sugere uma alteração da conformação proteica por efeito do aquecimento.

A banda dos carbonos alifáticos aumentou ligeiramente de intensidade relativamente à banda dos carbonos alfa, o que indica que após o tratamento térmico, os carbonos alifáticos tornaram-se mais rígidos relativamente aos carbonos alfa. Na região dos carbonos alfa verifica-se que o sinal a 60 ppm diminuiu bastante de intensidade relativamente ao sinal a 53 ppm. A variação da intensidade relativa destes sinais sugere que os segmentos mais ricos em glutamina (53 ppm) se tornaram mais imobilizados relativamente aos segmentos mais ricos em prolina (60 ppm)

Com o tratamento térmico, os sinais derivados da ressonância do amido residual diminuíram de intensidade relativamente aos sinais derivados da ressonância das proteínas. Este resultado indica um aumento da mobilidade (menor intensidade) do amido, ou uma diminuição da mobilidade (maior intensidade) da proteína. Tal como é discutido mais à frente neste capítulo (§ IV.3.2.3), os valores de T_{1H} e T_{2H} apontam para uma maior imobilização da matriz proteica, pelo que a variação da intensidade observada para o sinal do amido deverá estar relacionado com a diminuição da mobilidade da proteína e, portanto, diminuição da intensidade do sinal, por efeito do tratamento térmico.

O aquecimento do glúten da variedade Sorraia até 95 °C (Figura 4.8c) não provocou alterações significativas no espectro ^{13}C -CP/MAS, relativamente ao observado para a amostra da mesma variedade aquecida até 80°C.

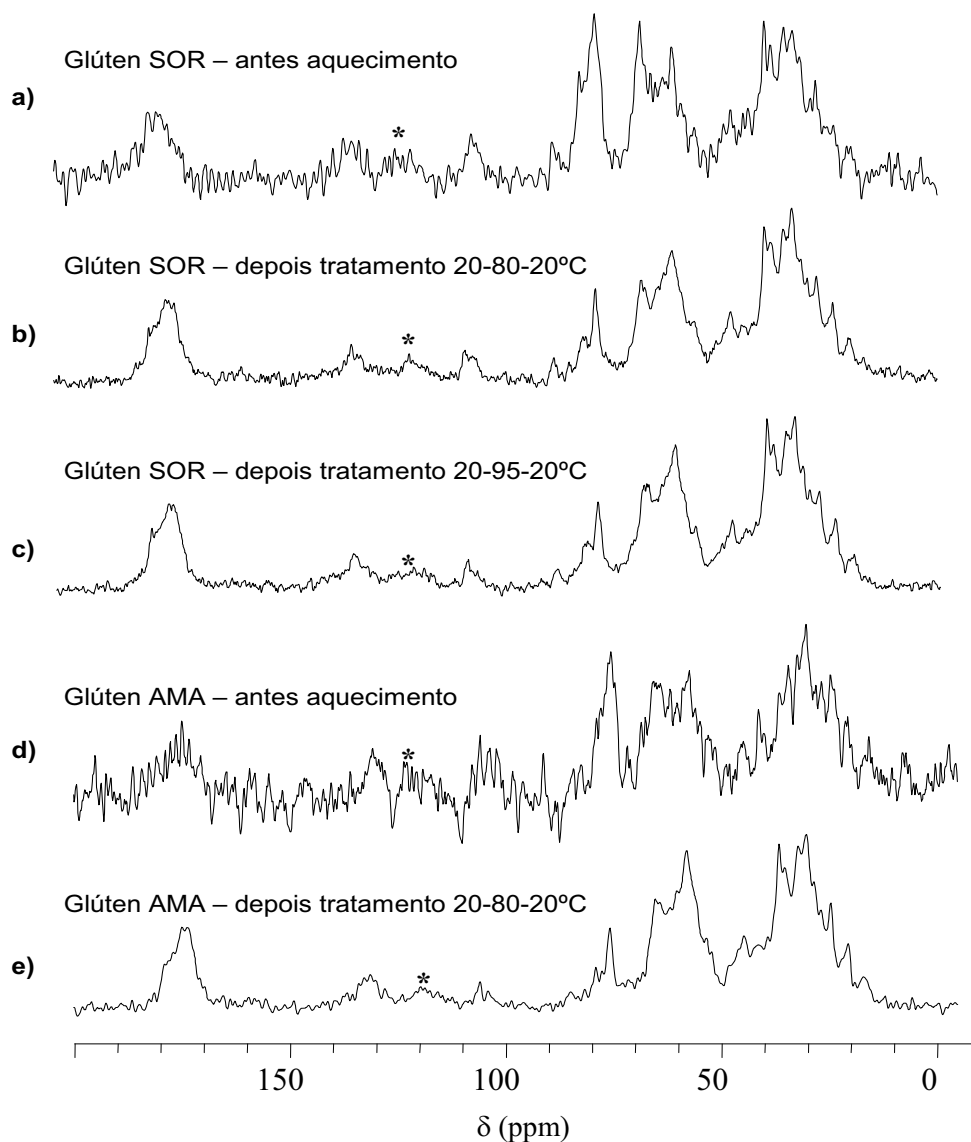


Figura 4.8 - Espectros ^{13}C /CPMAS amostras de glúten hidratado (50% D_2O m/m) antes e depois do aquecimento, 6 kHz; a)- glúten SOR, antes do tratamento térmico, ns=500; b)- glúten SOR, depois do tratamento térmico 20-80-20°C, ns=3600; c)- glúten SOR, depois do tratamento térmico 20-95-20°C, ns=3600; d)- glúten AMA, antes do tratamento térmico, ns=50; e)- glúten AMA, depois do tratamento térmico 20-80-20°C, ns=2000; * - bandas laterais de rotação;

A Figura 4.9 apresenta os espectros de ^{13}C -SPE das amostras de glúten das variedades Amazonas e Sorraia hidratadas a 50% (m/m), adquiridos antes (Figura 4.9 a,d) e depois do tratamento térmico (Figura 4.9 b, c, e), com um tempo de intervalo entre scans de 5s.

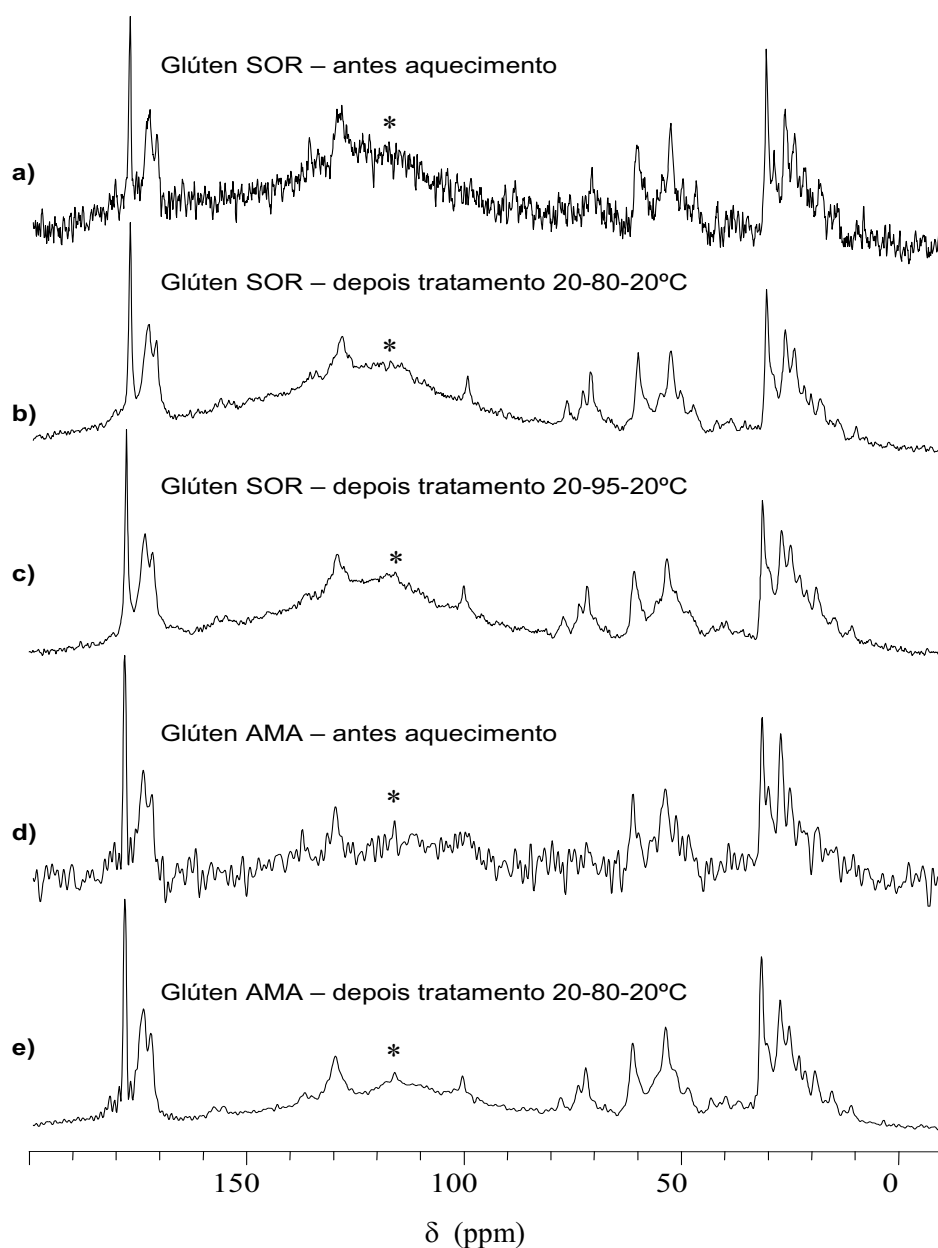


Figura 4.9 - Espectros ^{13}C - SPE amostras de glúten hidratado (50% D_2O m/m) antes e depois do aquecimento, 6 kHz; a)- glúten SOR, antes do tratamento térmico, ns=188; b)- glúten SOR, depois do tratamento térmico 20-80-20°C, ns=2160; c)- glúten SOR, depois do tratamento térmico 20-95-20°C, ns=2160; d)- glúten AMA, antes do tratamento térmico, ns=64; e)- glúten AMA, depois do tratamento térmico 20-80-20°C, ns=3000; * - bandas laterais de rotação.

Após o ciclo de aquecimento/arrefecimento, observa-se um aumento da razão sinal/ruído nos espectros de ^{13}C -SPE, o que indica um aumento de mobilidade, tendo como principal contribuição a elevada mobilidade dos lípidos residuais.

O aquecimento da amostra de glúten até 95°C (Figura 4.9 c) não introduziu qualquer alteração nos espectros de ^{13}C -SPE.

IV. 3.2.2. Caracterização por espectroscopia de ^1H

As amostras de glúten foram também caracterizadas através da espectroscopia de RMN de ^1H tendo-se adquirido espectros em amostras quer no estado seco, quer no estado hidratado (50% D_2O m/m). A espectroscopia de RMN de ^1H permite obter informação sobre os prótons nos ambientes mais móveis, complementando assim a informação obtida a partir dos espectros de ^{13}C .

IV. 3.2.2.1. Efeito da hidratação

O glúten foi primeiramente estudado no estado seco (0% D_2O). A Figura 4.10 apresenta os espectros da amostra de glúten no estado seco da variedade AMA adquiridos a diferentes velocidades de rotação. O comportamento observado para o glúten da variedade SOR foi bastante semelhante ao observado para o glúten da variedade AMA, pelo que só se apresentam os resultados para a variedade AMA.

O espectro da amostra registada em condições estáticas (Figura 4.10a) apresenta um pico largo centrado a 3,7 ppm que reflecte a contribuição da água residual, sobreposto sobre um componente mais largo originado pela contribuição de moléculas de proteína e de amido residual particularmente rígidos. O aumento da velocidade de rotação para 15 kHz (Figura 4.10b) conduziu a um estreitamento da banda do componente mais estreito, e o componente mais largo deu lugar ao aparecimento de bandas laterais de rotação. A rotação da amostra a velocidades mais elevadas conduz a uma medianização da heterogeneidade do campo magnético (diminuição da anisotropia), o que resulta numa melhoria de resolução (diminuição da largura de banda). Porém, as interacções anisotrópicas não desapareceram completamente, o que se traduziu no aparecimento das bandas laterais de rotação. O pico dominante foi deslocado para um desvio químico mais elevado ficando

centrado a 4,5 ppm e reflecte a presença de água residual. O sinal que aparecia a 0,78 ppm no espectro estático foi igualmente deslocado para 1,3 ppm e reflecte essencialmente a presença de populações proteicas particularmente móveis tais como grupos metilo descrevendo movimentos rápidos de rotação, bem como a presença de lípidos residuais.

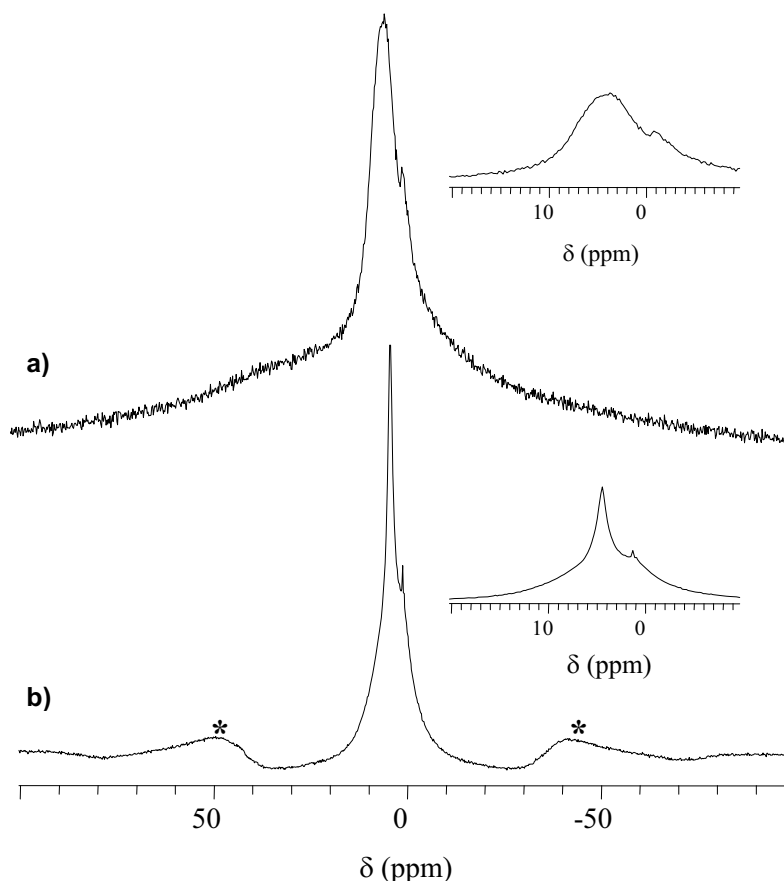


Figura 4.10 - Efeito da velocidade de rotação em amostras do glúten AMA seco - a) 0 kHz, ns=128; b) 15 kHz, ns=24; * - bandas laterais de rotação;

Para as amostras de glúten no estado seco ensaiadas a 15 kHz foram igualmente registados espectros de ^1H com eco de spin (spin-echo). A experiência de spin-echo selecciona os prótons mais móveis, i.e. aqueles com tempo de relaxação (T_{2H}) mais longo, e reduz o efeito da não-homogeneidade do campo magnético, diminuindo os efeitos da anisotropia manifestados pela menor resolução dos espectros (maior largura de banda), contribuindo para uma melhor resolução dos mesmos. A Figura 4.11 apresenta os espectros de ^1H -MAS e de ^1H com spin-echo com um tempo de espera (τ) de 1,5 ms para as amostras de glúten

AMA e SOR no estado seco, à velocidade de rotação de 15 kHz. As duas amostras apresentam espectros com um perfil algo diferente. Relativamente aos espectros de ^1H -MAS (espectros da esquerda) verifica-se que ambas as amostras apresentam um sinal largo centrado a 4,5 ppm como reflexo da presença de água residual. É ainda possível observar sinais a 0,92 ppm e 1,3 ppm, indicadores da elevada mobilidade dos grupos metilo derivados dos lípidos, e a 2,1 ppm como reflexo de uma maior mobilização de alguns componentes proteicos.

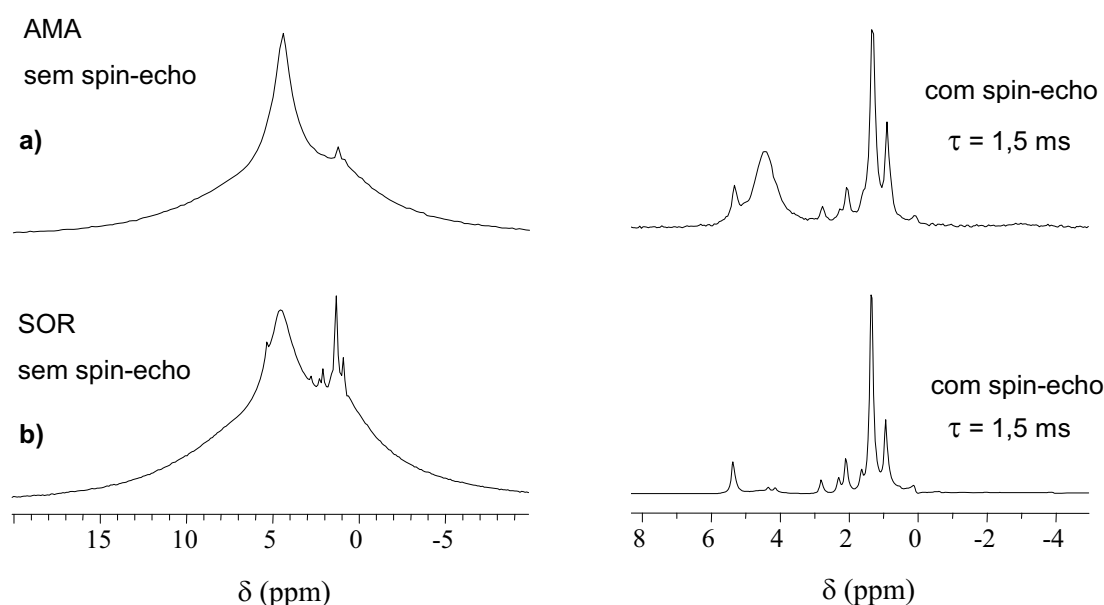


Figura 4.11 - Comparação entre os espectros de ^1H -MAS com (espectros da direita) e sem spin-echo (espectros da esquerda) para as duas variedades de glúten, no estado seco, a 15kHz de rotação - a) glúten AMA, ns= 138 b) glúten SOR, ns=36; espectros spin-echo: $\tau=1,5$ ms, a)-ns= 116, b) ns= 2032

Os espectros de ^1H -MAS com spin-echo apresentaram uma elevada resolução, observando-se a presença de um pico mais intenso de água no espectro do glúten AMA, o que sugere a presença de uma maior quantidade de água residual no glúten desta variedade. Nos espectros de ambas as variedades, os sinais a 0,92 ppm e a 1,3 ppm apresentam-se bastante resolvidos como resultado da elevada mobilidade dos lípidos. O sinal a 1,3 ppm apresenta-se mais intenso no espectro do glúten da variedade SOR, o que parece confirmar a existência de uma maior quantidade de lípidos residuais no glúten desta variedade.

Na caracterização do glúten no estado seco, foram também registados espectros de ^1H -MAS adquiridos a uma elevada velocidade de rotação (32 kHz). A Figura 4.12 apresenta os espectros de ^1H -MAS e os espectros de ^1H -MAS com spin-echo com diferentes tempos de espera, adquiridos a 32 kHz, para o glúten da variedade AMA.

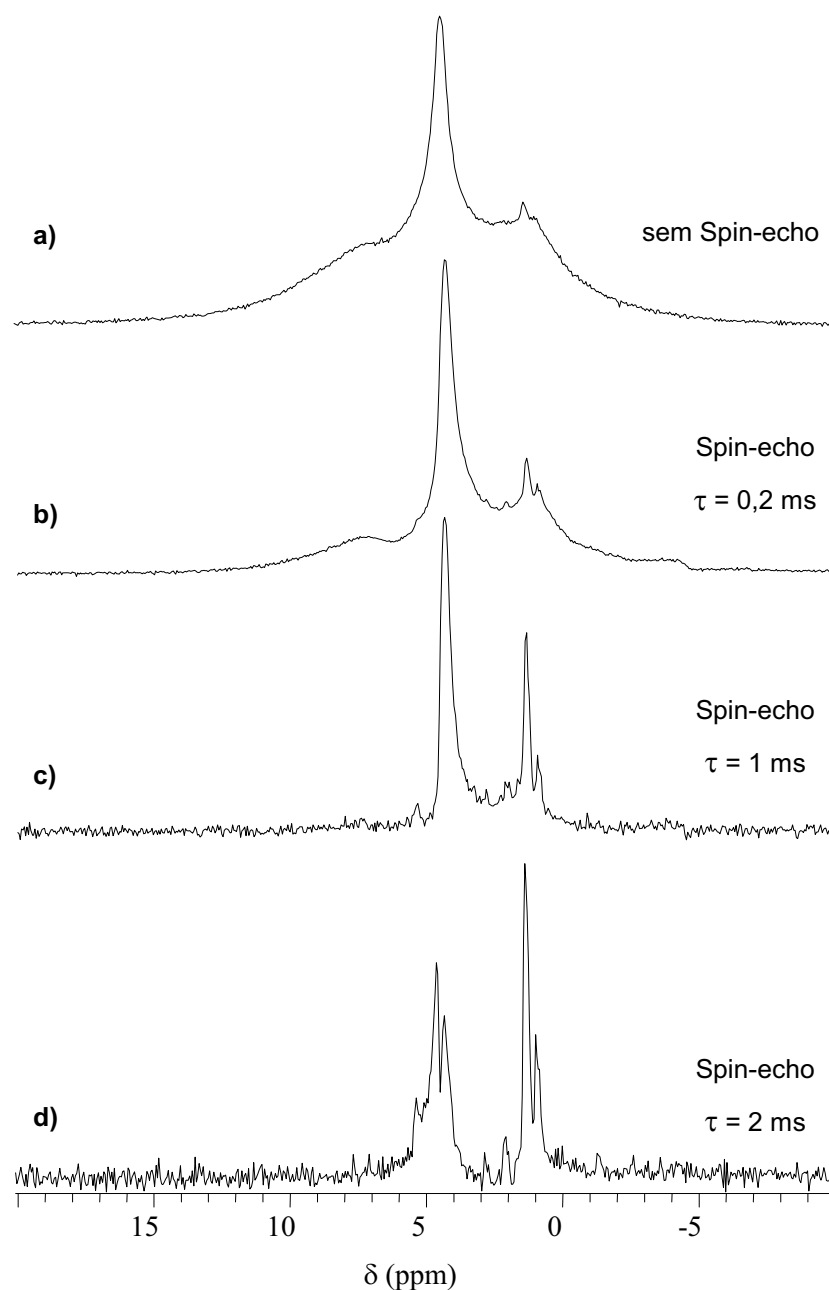


Figura 4.12 - Espectros ^1H -MAS da amostra de glúten AMA seco, a uma velocidade de rotação de 32kHz; a)- sem Spin-echo, ns=32 b)- com Spin-echo, $\tau = 0,2$ ms, ns= 24 c)- com Spin-echo, $\tau = 1$ ms, ns=36 d)- com Spin-echo, $\tau = 2$ ms, ns= 52

O espectro de ^1H -MAS adquirido a 32 kHz apresenta essencialmente os mesmos sinais observados no espectro adquirido a 15 kHz, porém apresentando uma melhoria da resolução.

Comparativamente ao espectro com spin-echo registado a 15 kHz, os espectros com eco de spin registados a 32 kHz não introduzem nenhuma informação adicional. Destaca-se apenas o facto de que para um o tempo $\tau = 2$ ms, o sinal da água a 4,4 ppm dividiu-se em dois sinais a 4,3 e 4,6 ppm.

A hidratação das amostras de glúten conduziu a grandes alterações nos espectros de ^1H -MAS, observando-se essencialmente um significativo aumento de resolução como resultado do grande aumento de mobilidade dos componentes no sistema induzido pelo efeito de plasticização da água. A Figura 4.13 apresenta um exemplo deste comportamento. A Tabela 4.2 apresenta as atribuições dos sinais do espectro de ^1H -MAS, baseadas em trabalhos publicados anteriormente (Wüthrich, 1986; Gil *et al*, 1997a,b; Sacco *et al.*, 1998; Alberti, 2000).

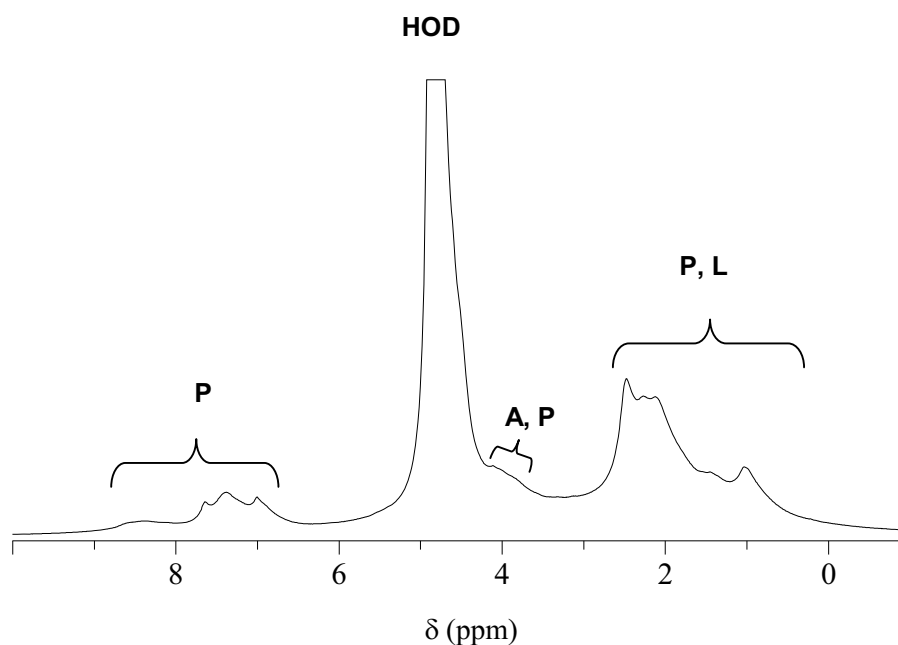


Figura 4.13 - Espectro ^1H /MAS do glúten AMA hidratado (50% D_2O m/m), 5kHz, ns=32; P- proteína, L- lípidos; A- amido; HOD- água deuterada

O espectro da Figura 4.13 apresenta-se dominado pelo pico da água (HOD) centrado a 4,8 ppm. Na região de 0-3 ppm observa-se a contribuição das ressonâncias alifáticas provenientes das cadeias laterais de aminoácidos tais como glutaminas, prolina e leucinas. A 4,1 ppm observa-se a contribuição das ressonâncias alfa provenientes da contribuição da proteína e de algum amido residual, observando-se ainda uma forte sobreposição do pico HOD sobre esta região. Na região de 6-9 ppm observa-se a contribuição dos aminoácidos aromáticos (6,9-7,4 ppm) sobrepostos com a contribuição dos prótons amídicos das cadeias laterais (7,6 ppm) e da cadeia principal (8,4 ppm) dos resíduos de glutaminas. Esta região do espectro reveste-se de grande importância na caracterização do glúten por ^1H -RMN, uma vez que reflecte somente o comportamento de componentes proteicos.

Tabela 4.2 - Atribuições dos desvios químicos dos espectros ^1H / MAS das amostras de glúten AMA (Wüthrich, 1986; Gil *et al*, 1997a,b; Sacco *et al.*, 1998; Alberti, 2000)

δ (ppm)	Atribuição	
	Tipo de carbono	Componente
1,03	CH_3 -	lípidos, leucina e valina
1,40	CH_3 -	lípidos, leucina, tirosina e alanina
2,10	$-\text{CH}_2-$	glutamina e prolina
2,30	$-\text{CH}_2-$	glutamina e prolina
2,50	$-\text{CH}_2-$	glutamina e arginina
3,8	$-\text{CH}$	prolina, amido residual
4,1	$-\text{CH}$	glicina, amido residual
4,8	HOD	água
5,5	$-\text{CHO}$	amido residual
6,9	$-\text{NH}_2$	anéis aromáticos de tirosina e fenilalanina
7,4	$-\text{NH}_2$	cadeias laterais de glutaminas
7,6	$-\text{NH}_2$	cadeias laterais glutaminas
8,4	$-\text{NH}$	Hidrogénios amídicos das cadeias central

IV. 3.2.2.2. Efeito do tratamento térmico 20-80-20°C

O comportamento das amostras de glúten ao longo do tratamento térmico foi seguido através da aquisição de espectros de ^1H -MAS a várias temperaturas. O aquecimento até 80°C e posterior arrefecimento foi efectuado *in situ* dentro da sonda de RMN, permitindo assim seguir as alterações resultantes do tratamento térmico. A Figura 4.14 apresenta a sequência de espectros adquiridos a 20°C (antes do tratamento térmico), 60°C, 80°C, 60°C e 20°C (depois do tratamento térmico). Dado que o comportamento das amostras ao longo do tratamento térmico foi semelhante para o glúten de ambas as variedades, na Figura 4.14 apenas se apresentam os espectros relativos à variedade AMA.

Com o aquecimento verifica-se um aumento da resolução em todas as regiões dos espectros, como resultado do encurtamento dos tempos de correlação dos vários prótons e dos tempos de relaxação T_{2H} mais longos, tal como será discutido mais à frente nesta secção. O aquecimento promoveu uma maior mobilização dos grupos proteicos, tal como se pode observar pelo marcado aumento da intensidade dos sinais da região dos prótons alifáticos (0-3 ppm) e dos prótons aromáticos e amídicos (6-9 ppm). Na região de elevado desvio químico, verifica-se que o aquecimento promoveu um acentuado aumento da intensidade do sinal a 7,2 ppm correspondente à ressonância dos prótons $-\text{NH}_2$ das cadeias laterais dos resíduos de glutaminas, tal como já anteriormente observado por Alberti (2000). O sinal a 7,6 ppm deslocou-se para mais baixo desvio químico, sobrepondo-se ao sinal 7,4 ppm, tal como esperado (Alberti, 2000). A deslocação para mais baixo desvio químico é uma indicação do enfraquecimento das ligações de hidrogénio, pelo que os resultados indicam que, com o aquecimento, as ligações de hidrogénio estabelecidas com as cadeias laterais de glutamina se tornam mais fracas. O aumento da intensidade do sinal a 7,4 ppm sugere que os prótons $-\text{NH}_2$ das cadeias laterais se tornaram mais móveis com o aumento da temperatura, o que poderá ser devido à quebra das ligações de hidrogénio por efeito do aumento da temperatura do sistema. Este efeito foi igualmente observado por outros autores (Alberti, 2000). O aquecimento promoveu igualmente a maior mobilização do amido residual, a 4,1 ppm e 5,4 ppm. O mesmo comportamento foi observado para as amostras de amido tal como será discutido no capítulo VI.

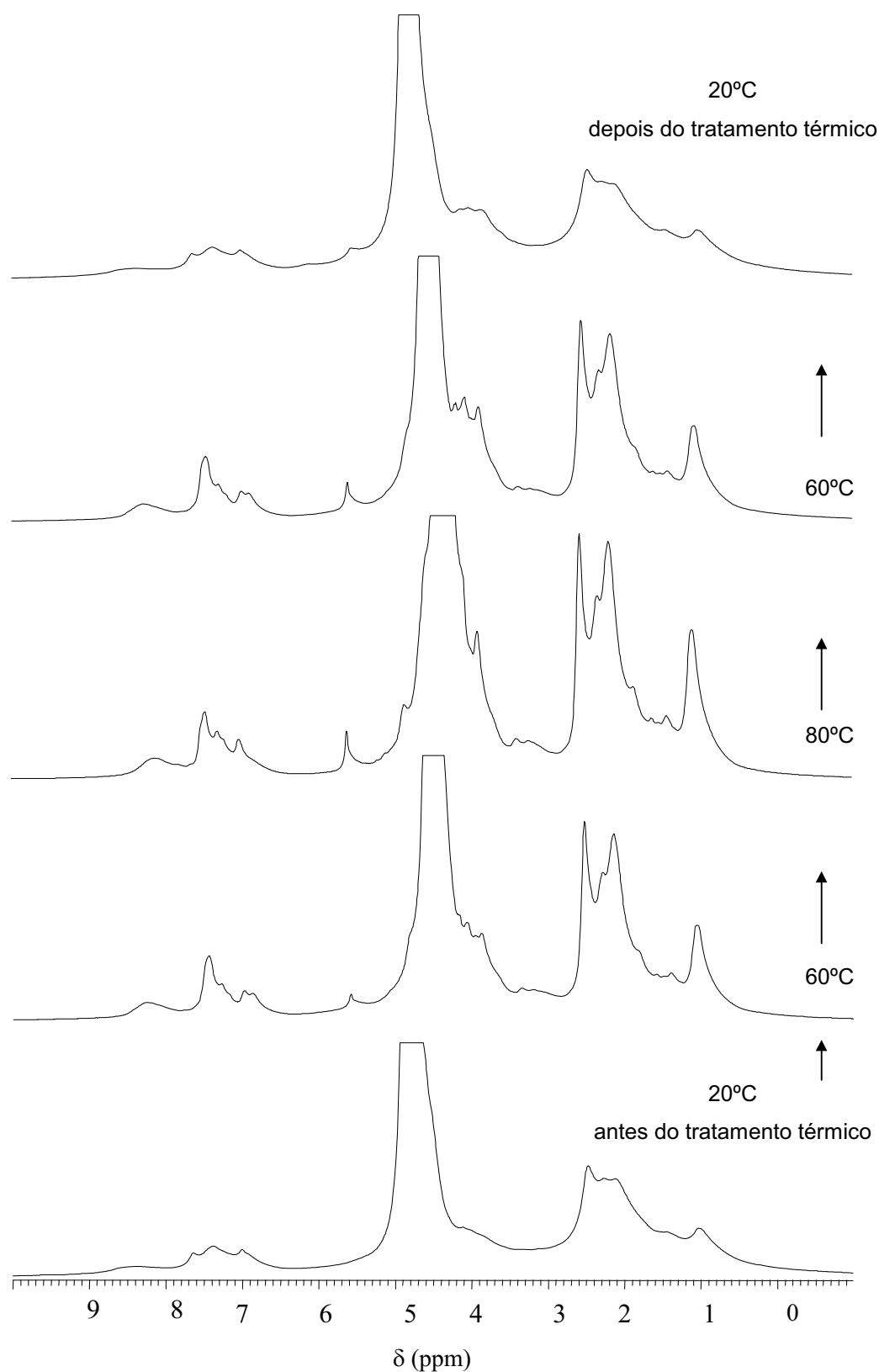


Figura 4.14 - Comportamento ao longo do ciclo de aquecimento (20-80°C) e arrefecimento (80-20°C); todos os espectros adquiridos a 5 kHz e ns= 32.

O comportamento observado ao longo do aquecimento parece ter sido reversível, uma vez que após o arrefecimento o espectro recuperou essencialmente o perfil inicial. Apenas os sinais derivados do amido residual não recuperaram completamente, conseguindo-se ainda observar os sinais a 3,8-4,1 ppm e a 5,5 ppm, como resultado de uma maior organização molecular (cristalização).

IV. 3.2.2.3. Tempos de Relaxação Longitudinal (T_{1H}) e Transversal (T_{2H}) de Protão

No sentido de complementar o estudo do efeito do tratamento térmico nas amostras de glúten, foram efectuadas medições dos tempos de relaxação T_{1H} e T_{2H} em amostras de glúten hidratadas a 50% (m/m) com D_2O . Numa primeira parte deste subcapítulo são apresentados os resultados referentes apenas ao glúten da variedade SOR de modo a avaliar o efeito do tratamento térmico nos valores de T_{1H} e T_{2H} . A comparação do efeito do tratamento térmico entre as duas variedades de glúten é apresentada posteriormente, comparando-se apenas o comportamento ao nível do T_{2H} .

IV. 3.2.2.3.1. Tempo de relaxação T_{1H}

As Tabelas 4.4 e 4.5 apresentam os valores dos tempos de relaxação T_{1H} para os sinais representativos dos sistemas de glúten submetidos a dois tratamentos térmicos diferentes, 20-80-20°C e 20-95-20°C, respectivamente.

Antes do aquecimento, verifica-se que os valores de T_{1H} da amostra destinada ao aquecimento a 95°C são um pouco mais elevados do que aqueles valores para a amostra destinada ao aquecimento a 80°C. Embora ambos os resultados sejam relativos a amostras da mesma variedade e a métodos de preparação iguais, uma ligeira variação da temperatura ou da quantidade de amostra poderão ter estado na origem da diferença de valores observada. Deste modo, apenas se fará aqui uma análise em termos de variações e não em termos de valores absolutos.

Para ambas as amostras, antes do aquecimento, verifica-se que os valores de T_{1H} são semelhantes para todos os picos visíveis, tendo em conta a gama de incerteza associada.

Tabela 4.4 - Valores dos tempos de relaxação longitudinal - T_{1H} - para o sistema de glúten da variedade Sorraia, hidratado a 50% (m/m) pelo método de massa não desenvolvida (método 2), submetido a tratamento térmico 20-80-20°C (n.d. - não detectável)

δ (ppm)	Atribuição		Temperaturas	
			T_{1H} (s) - 20°C antes tratamento térmico	T_{1H} (s) - 80°C após tratamento térmico
1,03	CH ₃ -	Lípidos + Proteína	0,628 ± 0,003	0,708 ± 0,032
2,10	-CH ₂ -	Lípidos + Proteína	0,624 ± 0,005	0,623 ± 0,013
2,50	-CH ₂ -		0,626 ± 0,002	0,594 ± 0,008
4,1	-CH	Proteína + Amido residual	0,640 ± 0,007	0,762 ± 0,042
4,8	HOD	Água	0,592 ± 0,014	0,642 ± 0,006
5,5	-CHO	Amido residual	n.d.	0,583 ± 0,089
6,9	-NH ₂	Proteína - aromáticos -	0,644 ± 0,012	0,624 ± 0,049
7,4	-NH ₂	Proteína - grupos laterais -	0,635 ± 0,010	0,738 ± 0,036
7,6	-NH ₂	Proteína - grupos laterais -	0,624 ± 0,011	n.d.
8,4	-NH	Proteína - cadeia central -	0,623 ± 0,009	0,520 ± 0,043

A aproximação dos valores de T_{1H} indica uma difusão de spin eficiente entre todos os componentes, sobretudo entre a água e a proteína, o que sugere uma eficiente hidratação de toda a matriz proteica.

Com o aquecimento até 80°C (tabela 4.4) ou até 95°C (tabela 4.5), verifica-se que os valores de T_{1H} da região alifática (1.0 - 2.50 ppm) variaram muito pouco, dado o erro associado. O sinal a 4,1 ppm, proveniente da contribuição do amido residual, bem como os sinais 6,9-8.4 ppm, característicos da proteína, apresentaram um aumento da mobilidade com o aquecimento, o que é confirmado pela subida dos valores de T_{2H} (§ IV.3.2.3.2). A 80°C verifica-se um aumento dos valores de T_{1H} da água, o que indica uma maior imobilização deste componente. A diminuição da mobilidade da água com o aquecimento a 80°C é confirmada pela diminuição do valor de T_{2H} , tal como discutido a seguir na secção IV.3.2.3.2. A 95°C, os valores de T_{1H} da água não variaram significativamente, tendo em conta a gama de incerteza associada.

À temperatura de 80°C, verifica-se alguma separação entre os componentes principais (água, amido e proteína) tal como indicado pela baixa proximidade dos valores de T_{1H} . Porém, a 95°C, todos os componentes apresentaram-se mais intimamente ligados, dada a eficiente difusão de spin (proximidade dos valores de T_{1H}).

Após o arrefecimento 80-20°C (tabela 4.4) verifica-se que os valores de T_{1H} dos prótons aromáticos (6,9 ppm) e dos prótons amídicos dos grupos laterais a 7,4 ppm apresentaram um comportamento reversível, apresentando valores de T_{1H} semelhantes aos registados antes do tratamento térmico. Porém, para os prótons amídicos de cadeia central (8,6 ppm) observou-se um aumento dos valores de T_{1H} após o tratamento térmico, revelando uma irreversibilidade do comportamento devido ao aquecimento do glúten. O aumento dos valores de T_{1H} indica um aumento da imobilidade destes prótons, o que sugere que o processo de desnaturação proteica teve início por uma alteração da configuração da cadeia central.

Após o arrefecimento 95-20°C, todos os sinais indicadores do comportamento da proteína apresentaram valores de T_{1H} mais elevados, o que sugere uma diminuição da mobilidade em todo o ambiente proteico, revelando uma desnaturação mais completa da proteína.

Para ambos os tratamentos térmicos, após aquecimento/arrefecimento, a água (4,8 ppm) apresentou um comportamento reversível relativamente aos valores de T_{1H} .

Tabela 4.5 - Valores dos tempos de relaxação longitudinal - T_{1H} - para o sistema de glúten da variedade Sorraia, hidratado a 50% (m/m) pelo método de massa não desenvolvida (método 2), submetido a tratamento térmico 20-95-20°C

δ (ppm)	Atribuição	Temperaturas		
		T_{1H} (s) - 20°C antes tratamento térmico	T_{1H} (s) - 95°C	T_{1H} (s) - 20°C após tratamento térmico
1,03	CH ₃ -	0,887 ± 0,083	0,905 ± 0,114	1,06 ± 0,09
2,10	-CH ₂ -	0,955 ± 0,090	0,810 ± 0,098	1,06 ± 0,10
2,50	-CH ₂ -	0,966 ± 0,076	0,815 ± 0,110	1,06 ± 0,09
4,1	-CH	0,987 ± 0,093	0,927 ± 0,160	1,13 ± 0,10
4,8	HOD	1,02 ± 0,01	0,858 ± 0,111	0,988 ± 0,080
5,5	-CHO	N.D.	1,06 ± 0,24	N.D.
6,9	-NH ₂	0,960 ± 0,076	1,04 ± 0,12	1,12 ± 0,11
7,4	-NH ₂	0,972 ± 0,079	1,11 ± 0,14	1,15 ± 0,09
7,6	-NH ₂	0,955 ± 0,074	N.D.	1,13 ± 0,11
8,4	-NH	0,966 ± 0,079	0,728 ± 0,121	1,21 ± 0,10

n.d. - não detectável

Após o ciclo 20-80-20°C, a água (4,8 ppm) e proteína (1,03-2,50 ppm e 6,9-7,4 ppm) encontram-se intimamente ligados (proximidade dos valores de T_{1H}), observando-se no entanto uma clara separação entre estes componentes, o amido (4,1 ppm e 5,5 ppm) e os prótons -NH de cadeia central (8,4 ppm).

Após o tratamento térmico 20-95-20°C, todos os componentes apresentaram valores de T_{1H} bastante próximos, o que indica uma hidratação uniforme da matriz proteica e uma difusão de spin eficiente em toda a matriz.

IV. 3.2.2.3.2. Tempo de relaxação T_{2H}

Os picos visíveis nos espectros do glúten apresentaram dois valores de T_{2H} , indicando a presença de duas populações de prótons com mobilidades diferentes. Os valores T_{2A} representam tempos de relaxação mais curtos e correspondem à fracção mais imóvel de prótons. Os tempos de relaxação T_{2B} são mais longos e correspondem à fracção mais móvel de prótons. A população de prótons respectiva a cada uma destas fracções pode ser quantificada a partir dos coeficientes a e b da equação 3.2 (III.2.4). As Tabelas 4.6 e 4.7 apresentam os valores de T_{2H} para os sistemas de glúten sujeitos aos dois tratamentos térmicos diferentes, onde estão apresentados os valores de T_{2A} e T_{2B} , bem como a percentagem de prótons móveis (correspondentes a T_{2B}).

Antes do aquecimento, os valores de T_{2H} foram diferentes entre as duas amostras sujeitas aos dois tratamentos térmicos diferentes, o que sugere, à semelhança do observado para os valores de T_{1H} , uma grande sensibilidade dos valores de T_{2H} face a variações nas condições experimentais, tais como ligeiras variações da temperatura ou da quantidade de amostra. Assim, mais uma vez, aqui apenas se analisam variações e não valores absolutos.

Para ambas as amostras, verifica-se que antes do tratamento térmico, as ressonâncias alifáticas (1,03-2,50 ppm), provenientes da contribuição de lípidos residuais e proteína, as ressonâncias dos prótons aromáticos e amídicos (6,9-8,4 ppm) apresentaram valores de T_{2H} semelhantes, dado o erro experimental associado, o que indica uma mobilidade de magnitude semelhante em todo o ambiente proteico. O sinal a 4,1 ppm apresentou valores de T_{2H} mais elevados, indicando uma maior mobilidade possivelmente devido à presença do amido residual. A água (4,8 ppm) apresentou-se como o componente mais móvel, tendo apresentado o valor mais elevado de T_{2H} .

Com o aquecimento a 80°C (tabela 4.6) ou a 95°C, todos os componentes apresentaram valores de T_{2H} mais elevados do que os registados antes do aquecimento, bem como uma maior percentagem de prótons móveis, declarando um aumento geral da mobilidade. No entanto, a 80°C, a água apresentou uma diminuição do valor de T_{2H} , sinónimo de uma diminuição da mobilidade, o que parece indicar que a água, a esta temperatura, não se encontra completamente no seu estado livre. Quer a 80°C quer a 95°C, o sinal a 8,4 ppm apresentou valores de T_{2H} mais baixos do que o sinal a 7,4 ppm, o que indica que os prótons de cadeia central se mantêm mais imobilizados do que os prótons dos grupos laterais, como é de esperar.

Após o tratamento térmico 20-80-20°C, verifica-se que a proteína (6,9-8,4 ppm) apresentou um valor de T_{2H} monoexponencial, sugerindo a formação de uma matriz uniforme, com uma mobilidade intermédia entre os valores de T_{2A} e T_{2B} iniciais. Os prótons de cadeia central (8,4 ppm) apresentaram o menor valor de T_{2H} , o que indica que estes prótons se encontram mais imobilizados do que os prótons amídicos dos grupos laterais (7,2-7,6 ppm), o que vai de encontro com os resultados obtidos para os tempos T_{1H} . A água apresenta-se mais móvel do que qualquer componente, apresentando o valor de T_{2H} mais elevado, com uma elevada percentagem de prótons móveis.

A 20°C, após o tratamento 20-95-20°C, verifica-se que os valores de T_{2H} diminuíram relativamente aos valores registados a 95°C, mas apresentaram-se bastante mais elevados do que os registados antes do tratamento térmico. Estes resultados indicam que os componentes se encontram ainda muito mobilizados, embora a percentagem de prótons móveis seja menor relativamente à percentagem observada antes do aquecimento. Seria de esperar que após o tratamento a 95°C o sistema se encontrasse mais imobilizado, devido ao processo de desnaturação proteica. Porém, como já foi referido, tal não se verificou. É possível que após o equilíbrio térmico a 20°C, o sistema demore algum tempo para atingir o equilíbrio estrutural, e a proteína apresente eventualmente apenas um componente (T_{2A}), de acordo com o observado para a amostra submetida ao tratamento 20-80-20°C.

Tabela 4.6 - Valores dos tempos de relaxação transversal - T_{2H} - para a amostra de glúten da variedade Sorraia, hidratada a 50% (m/m) , pelo método de massa não desenvolvida (método 2), submetida a tratamento térmico 20-80-20°C (n.d. - não detectável)

δ (ppm)	Atribuição	20°C			80°C			20°C		
		antes do tratamento térmico						depois do tratamento térmico		
		T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% prótons móveis (T_{2B})	T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% prótons móveis (T_{2B})	T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% prótons móveis (T_{2B})
1,03	CH ₃ -	0.183 ± 0.052	6.17 ± 2.16	27	0.219 ± 0.046	12.3 ± 1.0	56	0.446 ± 0.055	3.59 ± 0.32	48
2,10	-CH ₂ -	0.315 ± 0.113	3.51 ± 0.95	43	0.028 ± 0.033	6.57 ± 0.53	55	0.168 ± 0.058	2.20 ± 0.28	50
2,50	-CH ₂ -	0.201 ± 0.072	3.43 ± 0.52	58	0.166 ± 0.124	10.5 ± 0.4	90	0.090 ± 0.027	2.85 ± 0.22	60
4,1	Proteína + Amido residual	0.809 ± 0.107	7.01 ± 1.69	38	0.318 ± 0.152	9.87 ± 1.21	69	0.306 ± 0.052	5.96 ± 0.49	54
4,8	HOD	-	10,9 ± 0.44	-	0.100 ± 0.027	9.62 ± 0.12	89	0.334 ± 0.087	9.56 ± 0.11	91
5,5	Amido residual	n.d.	-	-	0.039 ± 0.022	24.2 ± 1.9	53	n.d.	-	-
6,9	Proteína aromáticos	0.150 ± 0.047	6.86 ± 1.72	40	0.661 ± 0.116	11.3 ± 1.1	63	-	2.81 ± 0.37	-
7,4	Proteína grupos laterais	0.195 ± 0.053	3.94 ± 0.48	54	0.269 ± 0.328	12.1 ± 1.3	85	-	2.34 ± 0.33	-
7,6	Proteína grupos laterais	0.225 ± 0.048	6.62 ± 0.60	52	n.d.		-	-	3.08 ± 0.39	-
8,4	Proteína aromáticos	-	1.77 ± 0.04	-	0.485 ± 0.140	7.33 ± 1.02	60	0.791 ± 0.178	-	-

Tabela 4.7 - Valores dos tempos de relaxação -transversal - T_{2H} - para a amostra de glúten da variedade Sorraia, hidratada a 50% (m/m), pelo método de massa não desenvolvida (método 2), submetida a tratamento térmico 20-95-20°C (n.d. - não detectável)

δ (ppm)	Atribuição	20°C			95°C			20°C		
		antes do tratamento térmico						depois do tratamento térmico		
		T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% protões móveis (T_{2B})	T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% protões móveis (T_{2B})	T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% protões móveis (T_{2B})
1,03	CH ₃ -	0.058 ± 0.015	1.85 ± 0.20	46	0.414 ± 0.076	37.5 ± 2.5	64	0.337 ± 0.053	14.3 ± 2.0	46
2,10	-CH ₂ -	0.095 ± 0.021	1.92 ± 0.20	54	0.059 ± 0.060	25.6 ± 3.6	65	0.438 ± 0.056	19.6 ± 2.0	49
2,50	-CH ₂ -	0.219 ± 0.091	2.61 ± 0.37	64	0.247 ± 0.088	28.9 ± 1.0	83	0.427 ± 0.096	19.1 ± 2.3	56
4,1	Proteína + Amido residual	0.571 ± 0.164	4.51 ± 0.99	49	0.279 ± 0.097	23.7 ± 1.5	80	0.525 ± 0.114	32.6 ± 3.7	64
4,8	HOD	-	6.65 ± 0.53	-	0.364 ± 0.114	22.2 ± 1.2	82	0.363 ± 0.272	51.8 ± 1.9	92
5,5	-CHO	n.d.	-	-	0.031 ± 0.009	62.3 ± 2.2	41	0.118 ± 0.023	19.5 ± 2.1	37
6,9	Proteína	0.087 ± 0.050	14.2 ± 3.5	42	1.42 ± 0.31	28.3 ± 2.9	56	0.329 ± 0.045	27.9 ± 1.9	54
7,4	Proteína aromáticos	0.164 ± 0.042	2.07 ± 0.25	59	0.225 ± 0.138	24.7 ± 1.7	81	0.425 ± 0.033	19.6 ± 0.9	53
7,6	Proteína grupos laterais	0.269 ± 0.048	4.02 ± 0.51	45	N.D.	-	-	0.547 ± 0.055	30.1 ± 2.5	46
8,4	Proteína grupos laterais	0.062 ± 0.031	0.608 ± 0.055	65	0.246 ± 0.048	10.9 ± 0.7	65	0.370 ± 0.040	13.4 ± 1.8	33

IV. 3.2.2.4. Efeito dos diferentes métodos de preparação nos tempos de relaxação T_{1H} e T_{2H}

Os sistemas de glúten foram igualmente preparados pelo método de massa desenvolvida (método 1) o qual envolveu a agitação mecânica das amostras. Para as amostras (50%, m/m, D₂O) preparadas por este método de preparação foram adquiridos espectros de RMN de ¹H-MAS. As amostras foram submetidas a um tratamento térmico *in situ*, numa gama de 20-80-20°C, e os tempos de relaxação foram medidos às temperaturas extremas.

IV. 3.2.2.4.1. Efeito do método de preparação nos valores de T_{1H}

A Tabela 4.8 apresenta os valores de T_{1H} registados a 20°C antes do tratamento térmico, 80°C e 20°C depois do tratamento térmico, para os sinais representativos dos vários componentes das amostras de glúten. Não tendo sido possível obter resultados de T_{1H} para o glúten da variedade SOR antes do aquecimento, e para o glúten da variedade AMA depois do aquecimento, admite-se que o comportamento observado para ambas as variedades será semelhante, dado que os valores registados para a temperatura de 80°C foram igualmente semelhantes.

Comparando os valores da Tabela 4.8 com os valores da Tabela 4.4 (glúten Sorraia, hidratado a 50% (m/m) pelo método de massa não desenvolvida) verifica-se que antes do aquecimento, os valores de T_{1H} são bastante semelhantes, o que sugere que, pelo menos antes do tratamento térmico, o método de preparação não influencia os valores de T_{1H} . Para a amostra preparada pelo método de massa desenvolvida, todos os componentes apresentaram valores de T_{1H} relativamente próximos entre si, o que indica uma proximidade entre eles. No entanto, a água apresentou um valor ligeiramente inferior aos dos restantes componentes, o que sugere uma ligeira separação da água no sistema. Contrariamente ao observado para os sistemas preparados pelo método de massa não desenvolvida, os prótons amídicos e aromáticos apresentaram valores de T_{1H} ligeiramente mais elevados do que os restantes componentes, o que indica que estes prótons se encontram mais rígidos no sistema, provavelmente devido ao reforçamento e maior

Tabela 4.8 - Valores dos tempos de relaxação longitudinal - T_{1H} - para as amostras de glúten das variedades Sorraia e Amazonas, hidratadas a 50% (m/m) pelo método de massa desenvolvida (método 1), submetidas a tratamento térmico 20-80-20°C (n.d. - não detectável)

δ (ppm)	Atribuição	Temperaturas			
		T_{1H} (s) - 20°C antes tratamento térmico	T_{1H} (s) - 80°C Glúten AMA	T_{1H} (s) - 80°C Glúten SOR	T_{1H} (s) - 20°C após tratamento térmico
1,03	CH ₃ - Lípidos + Proteína	0,774 ± 0,007	0,731 ± 0,005	0,744 ± 0,024	0,735 ± 0,009
2,10	-CH ₂ - Lípidos + Proteína	0,649 ± 0,005	0,692 ± 0,008	0,676 ± 0,008	0,780 ± 0,003
2,50	-CH ₂ -	0,661 ± 0,004	0,624 ± 0,107	0,616 ± 0,011	0,774 ± 0,003
4,1	-CH Proteína + Amido	0,646 ± 0,022	0,702 ± 0,008	0,684 ± 0,010	0,789 ± 0,006
4,8	HOD Água	0,592 ± 0,009	0,706 ± 0,016	0,669 ± 0,011	0,731 ± 0,009
5,5	-CHO Amido residual	n.d.	0,822 ± 0,015	0,838 ± 0,042	0,752 ± 0,024
6,9	-NH ₂ Proteína - aromáticos -	0,776 ± 0,018	0,861 ± 0,013	0,865 ± 0,019	0,769 ± 0,029
7,4	-NH ₂ Proteína - grupos laterais -	0,743 ± 0,018	0,892 ± 0,011	0,845 ± 0,011	0,790 ± 0,012
7,6	-NH ₂ Proteína - grupos laterais -	0,782 ± 0,019	n.d.	n.d.	0,782 ± 0,017
8,4	-NH Proteína - cadeia central -	n.d.	0,740 ± 0,002	0,663 ± 0,012	0,764 ± 0,022

desenvolvimento da matriz proteica, devido ao “input” mecânico introduzido durante a preparação da amostra.

Com o aquecimento até 80°C, os valores de T_{1H} aumentaram ligeiramente, o que indica um aumento da rigidez de todos os componentes no sistema. Para esta temperatura, os valores de T_{1H} observados foram bastante semelhantes entre as duas variedades. A água registou uma subida mais acentuada do valor de T_{1H} relativamente aos restantes componentes, indicando uma maior mobilização da água, tal como confirmado pelos valores de T_{2H} .

Com o arrefecimento, observa-se um aumento generalizado de todos os valores de T_{1H} sendo estes bastante próximos entre si, sugerindo a formação de uma matriz uniforme. A água apresentou um valor de T_{1H} ligeiramente mais baixo do que os restantes componentes, o que sugere uma maior imobilização. Contrariamente ao observado para a amostra preparada pelo método de massa não desenvolvida, os prótons -NH da cadeia central (8,4 ppm) apresentaram um valor de T_{1H} bastante próximo aos valores de T_{1H} dos prótons -NH₂ dos grupos laterais (7,4-7,6 ppm) e prótons aromáticos (6,9 ppm), e todos estes, por sua vez, apresentaram valores bastante semelhantes aos registados antes do tratamento térmico. Estes resultados sugerem uma reversibilidade do comportamento ao nível do T_{1H} , não se antevendo o início do processo de desnaturação proteica.

IV. 3.2.2.4.2. Efeito do método de preparação nos valores de T_{2H}

O efeito do método de preparação nos valores de T_{2H} , foi avaliado fazendo a comparação do comportamento do T_{2H} das amostras de glúten da variedade SOR, preparadas pelo método de massa não desenvolvida (método 2) e pelo método de massa desenvolvida (método 1). Os valores de T_{2H} da amostra de glúten SOR (50% m/m D₂O) preparada pelo método de massa desenvolvida, registados para as temperaturas 20-80-20°C, estão apresentados na Tabela 4.9.

Comparando os valores da Tabela 4.9 com os valores da Tabela 4.6 (glúten Sorraia, hidratado a 50% (m/m) pelo método de massa não desenvolvida) verifica-se que antes do aquecimento os valores de T_{2H} são relativamente semelhantes entre as duas amostras, salientando-se apenas o diferente comportamento observado para a água (4,8 ppm), e para os prótons -NH da cadeia central (8,4 ppm).

Tabela 4.9 - Valores dos tempos de relaxação transversal- T_{2H} - para a amostra de glúten da variedade Sorraia, hidratada a 50% (m/m) pelo método de massa desenvolvida, submetida a tratamento térmico 20-80-20°C (n.d. - não detectável)

δ (ppm)	Atribuição	20°C			80°C			20°C		
		antes do tratamento térmico						depois do tratamento térmico		
		T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% protões móveis (T_{2B})	T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% protões móveis (T_{2B})	T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% protões móveis (T_{2B})
1,2	CH ₃ -	0.524 ± 0.112	4.62 ± 0.79	47	0.375 ± 0.085	10.5 ± 0.4	81	0.322 ± 0.038	4.01 ± 0.38	44
2,1	-CH ₂ -	N.D.	N.D.	N.D.	0.127 ± 0.327	6.47 ± 0.28	96	0.369 ± 0.042	2.62 ± 0.28	46
2,4	-CH ₂ -	0.639 ± 0.191	4.04 ± 0.85	52	-	10.1 ± 0.3		0.471 ± 0.036	3.51 ± 0.16	54
3,8	-CH	0.534 ± 0.184	4.34 ± 0.96	53	-	7.87 ± 0.24		0.447 ± 0.094	3.85 ± 0.75	43
4,8	HOD	1.94 ± 0.53	5.16 ± 0.85	78	-	8.02 ± 0.07		1.66 ± 0.65	5.87 ± 0.23	90
5,1	-CHO	n.d.	n.d.		-	3.90 ± 0.97		0.183 ± 0.061	5.32 ± 2.35	27
6,9	-NH ₂	0.398 ± 0.131	4.45 ± 0.60	13	-	9.44 ± 1,10		0.235 ± 0.088	3.27 ± 0.29	74
7,3	-NH ₂	0.676 ± 0.123	3.97 ± 0.56	51	-	12.0 ± 0.6		0.356 ± 0.089	3.04 ± 0.26	65
7,5	-NH ₂	0.765 ± 0.135	6.51 ± 1.05	48	n.d.	-		0.682 ± 0.132	5.46 ± 0.67	56
8,3	-NH	0.289 ± 0.012	-	-	-	3.92 ± 0.20		0.095 ± 0.022	1.43 ± 0.16	51

Para a amostra preparada pelo método de massa desenvolvida, a água apresentou um valor de T_{2H} com duas componentes (T_{2A} e T_{2B}), o que indica que a água se encontra em dois ambientes com mobilidades distintas.

Com o aquecimento até 80°C, a amostra preparada pelo método de massa desenvolvida apresentou um comportamento um pouco diferente da amostra preparada pelo método de massa não desenvolvida. À exceção dos sinais a 1,2 e 2,1 ppm, todos os restantes sinais apresentaram um valor de T_{2H} apenas com uma componente, o que sugere a existência de um só ambiente (mobilidade homogênea) para estes prótons. No entanto, todos os valores de T_{2H} aumentaram relativamente aos valores observados no início do tratamento térmico, o que indica um aumento da mobilidade geral do sistema, por efeito do aquecimento.

Após o arrefecimento, verifica-se que para a amostra preparada pelo método de massa desenvolvida todos os componentes apresentaram um valor de T_{2H} com duas componentes, observando-se valores semelhantes aos registados no início do tratamento térmico, sugerindo uma reversibilidade do comportamento para a grande maioria dos componentes.

Assim, relativamente aos tempos de relaxação T_{1H} e T_{2H} , os diferentes métodos de preparação parecem ter exercido efeito essencialmente sobre o comportamento da água e da proteína. O “input” mecânico introduzido no método de massa desenvolvida deverá ter contribuído para um fortalecimento da matriz proteica, tornando-a provavelmente mais resistente ao tratamento térmico, pelo que o aquecimento até 80°C não terá sido suficiente para induzir a alteração da estrutura da proteína, i.e. desnaturação proteica.

IV. 3.2.2.5. Efeito da variedade no tempo de relaxação T_{2H}

O comportamento das amostras de glúten das duas variedades, AMA e SOR, preparadas pelo método de massa desenvolvida foi comparado ao nível do tempo de relaxação T_{2H} . Os valores de T_{2H} do glúten da variedade AMA (50% m/m), registados para as temperaturas 20-80-20°C, estão apresentados na Tabela 4.10.

A 20°C, os valores de T_{2H} são bastante idênticos entre ambas as variedades. Todos os componentes apresentaram um comportamento bi-exponencial, traduzido pelos dois valores de T_{2H} (T_{2A} e T_{2B}).

Tabela 4.10 - Valores dos tempos de relaxação transversal - T_{2H} - para a amostra de glúten da variedade Amazonas, hidratada a 50% (m/m) pelo método de massa desenvolvida (método 1), submetida a tratamento térmico 20-80-20°C (n.d.- não detectável)

δ (ppm)	Atribuição	20°C			80°C			20°C		
		antes do tratamento térmico						depois do tratamento térmico		
		T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% protões móveis (T_{2B})	T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% protões móveis (T_{2B})	T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% protões móveis (T_{2B})
1,2	CH ₃ -	0.433 ± 0.045	6.93 ± 0.43	55	0.502 ± 0.918	12.2 ± 0.5	79	0.261 ± 0.040	6.58 ± 0.60	50
2,1	-CH ₂ -	0.455 ± 0.043	3.90 ± 0.24	52	0.114 ± 0.116	6.69 ± 0.26	91	0.332 ± 0.033	3.32 ± 0.22	49
2,4	-CH ₂ -	0.526 ± 0.058	4.40 ± 0.22	60	0.354 ± 0.124	11.2 ± 0.2	92	0.438 ± 0.050	3.48 ± 0.22	55
3,8	-CH	0.523 ± 0.119	4.50 ± 0.64	51	0.061 ± 0.065	7.83 ± 0.27	88	0.424 ± 0.064	4.47 ± 0.50	47
4,8	HOD	1.24 ± 0.40	8.73 ± 0.20	93	0.629 ± 0.426	7.83 ± 0.27	98	0.068 ± 0.059	3.29 ± 0.09	90
5,1	-CHO	n.d.	-		-	10.0 ± 1,3	-	0.273 ± 0.036	7.13 ± 0.94	35
6,9	-NH ₂	0.519 ± 0.096	5.47 ± 0.67	50	-	8,48 ± 1,7	-	0.541 ± 0.092	5.31 ± 0.82	89
7,3	-NH ₂	0.589 ± 0.097	3.64 ± 0.28	60	-	1,24 ± 0,50	-	0.439 ± 0.162	3.34 ± 0.61	56
7,5	-NH ₂	0.701 ± 0.093	7.56 ± 1.00	44	n.d.	-	-	0.380 ± 0.100	5.29 ± 0.82	52
8,3	-NH	0.038 ± 0.014	1.27 ± 0.17	38	0.971 ± 0.416	6.84 ± 0.94	71	0.069 ± 0.033	1.43 ± 0.23	54

No glúten da variedade AMA, a água apresentou-se mais mobilizada do que os restantes componentes, e também mais mobilizada relativamente ao glúten da variedade SOR, tendo apresentado um valor de T_{2H} mais elevado.

Com o aquecimento, observou-se um aumento dos valores de T_{2H} para a maioria dos componentes do glúten AMA, indicando um aumento da mobilidade do sistema, à semelhança do observado para o glúten SOR. Comparando os valores de T_{2H} a 80°C para ambas as variedades, verifica-se que no glúten AMA apenas o amido e os componentes proteicos da região 6,9-8,4 ppm apresentaram um valor de T_{2H} . Contrariamente ao observado para o glúten da variedade SOR, no glúten da variedade AMA a água apresentou uma ligeira diminuição dos valores de T_{2H} , indicando uma ligeira imobilização da água. A água apresentou ainda dois componentes de T_{2H} , o que indica que esta se encontra em dois ambientes com mobilidades diferentes.

Após o arrefecimento da amostra de glúten AMA, todos os componentes recuperaram valores semelhantes aos valores iniciais, reflectindo um comportamento essencialmente reversível, tal como observado para o glúten da variedade SOR. No glúten AMA, a água apresentou uma mobilidade semelhante à dos restantes componentes, com valores de T_{2H} da mesma magnitude. Comparativamente ao glúten SOR, a água parece estar mais imobilizada no glúten AMA, tendo-se observado um valor de T_{2H} para a água inferior relativamente ao valor apresentado no glúten SOR.

IV. 4. Conclusões

Neste capítulo, as amostras de glúten extraídas das farinhas de trigo *Amazonas* e *Sorraia* foram caracterizadas através de estudos de reologia fundamental e de espectroscopia de RMN de sólidos.

A principal diferença observada no comportamento viscoelástico dos glútenos hidratados das duas variedades foi o carácter viscoso mais acentuado para o glúten SOR.

O estudo por RMN de sólidos revelou uma menor mobilidade das cadeias proteicas no caso do glúten hidratado da variedade SOR, o que poderá estar relacionado com os valores

ligeiramente superiores de módulo de conservação exibidos por este sistema, não explicando, contudo, o maior carácter viscoso, associado a maior dissipação de energia aquando da solicitação dinâmica, observado a nível reológico (macroscópico) para esta variedade.

O aquecimento do glúten leva a um aumento da densidade de interações intermoleculares e a um aumento do carácter elástico da rede, observado nos ensaios reológicos, o que está de acordo com a diminuição da mobilidade das cadeias proteicas, observada a nível molecular nos ensaios de RMN. Ao contrário do observado para o módulo G' , o módulo G'' apresentou um comportamento reversível, o que sugere que o tratamento térmico parece ter afectado sobretudo a componente elástica do glúten. O aumento de rigidez observada para os componentes proteicos foi confirmado pelos valores T_{1H} e T_{2H} registados após tratamento térmico. A alteração da conformação das proteínas por efeito do aquecimento parece iniciar-se pelos grupos $-NH_2$ das cadeias laterais e $-NH$ das cadeias centrais, tal como revelado pelos maiores valores de T_{1H} e menores valores de T_{2H} particularmente apresentados por estes grupos após o ciclo de aquecimento/arrefecimento. Este efeito foi igualmente observado ao nível de RMN para os mesmos grupos de protão nas farinhas de ambas as variedades.

A água apresenta uma dinâmica diferente nos glúten das duas variedades, tal como revelado pelos tempos de relaxação T_{2H} . No glúten da variedade AMA a água apresentou-se mais mobilizada do que no glúten da variedade SOR, revelando a existência de uma diferente interacção entre a água e os restantes constituintes da matriz proteica nos glúten das duas diferentes variedades, o que poderá estar na origem do diferente comportamento reológico observado entre os glúten das duas variedades.

O trabalho mecânico (mistura) aquando da hidratação das amostras de glúten tem um claro efeito sobre a organização do sistema, quer a nível molecular quer a nível macroscópico. Do ponto de vista reológico, o trabalho mecânico imposto ao sistema contribui para o aumento da densidade de interações intermoleculares responsáveis por um maior valor do módulo de conservação e por uma menor mobilidade macromolecular na escala de tempo analisada. Através dos tempos de relaxação de T_{2H} é possível concluir que ocorre uma maior imobilização dos protões $-NH_2$ e $-NH$, provavelmente associada ao estabelecimento de um maior número de pontes de hidrogénio entre as cadeias proteicas, o que está de

acordo com o efeito observado no comportamento reológico. A preparação das amostras com introdução de trabalho mecânico, conduziu a uma distribuição menos homogênea da água no sistema, encontrando-se esta em dois ambientes com mobilidades distintas, tal como revelado pelos valores de T_{2H} .

CAPÍTULO V

INFLUÊNCIA DAS PENTOSANAS HIDROSSOLÚVEIS NAS PROPRIEDADES VISCOELÁSTICAS E ESPECTROSCÓPICAS DO GLÚTEN



V. 1. Introdução

As pentosanas constituem apenas uma pequena fracção (2-3%) da composição total de uma farinha de trigo. Porém, é reconhecido por vários autores (D'Appolonia *et al.*, 1970; Jelaca e Hlynka, 1971, 1972; Lineback *et al.*, 1977; Yeh *et al.*, 1980; Izydorczyk *et al.*, 1991; Michniewicz *et al.*, 1991; Yin e Walker, 1992) que as suas características hidrofílicas e gelificantes influenciam a qualidade do produto final de um processo de panificação (§ I.1.3.3.1)

É reconhecido que as pentosanas hidrossolúveis (PHS) desempenham um papel importante na formação e nas propriedades do glúten (Udy, 1957; Hosene *et al.*, 1969, Michniewicz *et al.*, 1991; Roels *et al.*, 1993, Gama *et al.*, 2000), o que estará associado à sua afinidade para a água, embora de um modo indirecto, diminuindo a quantidade de água disponível para a hidratação do glúten. Porém, o mecanismo responsável pelo efeito das PHS sobre as propriedades funcionais do glúten ainda não é totalmente conhecido, mas envolverá outros efeitos para além de um efeito de competição para a água disponível. Patil *et al.* (1975), através de estudos de espectroscopia de infravermelho sugeriram que as PHS apresentam um papel activo na formação de ligações de hidrogénio entre os componentes da massa de farinha, nomeadamente com os grupos –NH das proteínas do glúten. Recentemente, alguns autores (Labat *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002) sugeriram que as PHS exercem um efeito directo sobre a formação da rede de glúten por mediação de resíduos de ácido ferúlico.

O efeito das PHS nas propriedades reológicas do glúten tem sido estudada por vários autores (Jelaca e Hlynka, 1971, 1972; Kim e D'Appolonia, 1977b; Meuser e Suckow, 1988; Michniewicz *et al.*, 1991; Vanhamel *et al.*, 1993; Roels *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2002) através de aparelhos tais como farinógrafos (Michniewicz *et al.*, 1991), mixógrafos (Vanhamel *et al.*, 1993), extensiógrafos e texturómetros (Wang *et al.*, 2002) Porém, estes estudos apenas revelam o efeito das PHS ao nível da absorção de água, tempo de desenvolvimento e consistência da massa, extensibilidade e resistência à extensão. O estudo do comportamento reológico através de ensaios de reologia fundamental não foi ainda muito explorado. Lichtendonk *et al.* (2000) analisou o efeito de PHS em sistemas de farinha e de gluteninas através de ensaios de fluência e de relaxação, tendo avaliado o efeito das PHS na extensibilidade e tenacidade da massa. Estes autores referiram que a adição de PHS contribui para a diminuição da elasticidade

da massa por interferência com as gluteninas, aumentando no entanto a tenacidade da massa devido às propriedades gelificantes das PHS.

O efeito das PHS no glúten através de estudos de ressonância magnética nuclear ainda não foi descrito. A combinação de estudos de espectroscopia de RMN e de reologia fundamental apresenta um enorme potencial para a compreensão das interações entre o glúten e as PHS.

Neste capítulo, é descrito o estudo do efeito das PHS nas propriedades viscoelásticas e dinâmicas do glúten extraído das farinhas de trigo das variedades *Amazonas* e *Sorraia*. A avaliação do efeito das PHS no glúten foi efectuada em amostras hidratadas de glúten com diferentes concentrações de PHS, através de estudos de reologia fundamental e de estudos de espectroscopia de ressonância magnética e nuclear (RMN). O comportamento reológico foi seguido através de ensaios de varrimento de frequência de oscilação e de varrimento de temperatura, avaliando-se assim o comportamento viscoelástico das amostras, bem como o comportamento das mesmas ao longo do tratamento térmico. Ao nível espectroscópico, foram realizados estudos de RMN de ^{13}C -CP/MAS e ^1H -MAS, em amostras constituídas por glúten e PHS, tendo-se avaliado o efeito da adição das pentosanas na dinâmica molecular através do estudo dos tempos de relaxação transversal e longitudinal de ^1H .

V. 2. Materiais e Métodos

V. 2.1. Amostras

As amostras de glúten e de pentosanas hidrossolúveis (PHS) de cada uma das variedades foram obtidas a partir do fraccionamento das farinhas AMA e SOR, tal como descrito em § II.2.1.

V. 2.2. Preparação das amostras

V. 2.2.1. Preparação das amostras para o estudo por reologia

Para o estudo do efeito das PHS nas propriedades reológicas do glúten foram preparados sistemas de glúten com 1% (m/m), 5% (m/m) e 10% (m/m) de PHS purificadas (com baixo teor de proteínas). Foram igualmente preparados sistemas de

glúten + PHS originais (PHS-orig) com o objectivo de se comparar o efeito da purificação (tratamento com argila) das PHS no comportamento do glúten. No sentido de se comparar o efeito das PHS nas amostras de glúten da outra variedade, prepararam-se amostras cruzadas de glúten + PHS (PHS-cr) com 10% (m/m) de PHS, obtendo-se as combinações [glúten AMA + 10% PHS SOR] e [glúten SOR + 10% PHS AMA]. As misturas foram preparadas a seco e hidratadas a 50% (m/m) com água desionizada, tendo em conta o teor de humidade do glúten e das PHS. As amostras foram depois misturadas com a ajuda de uma vareta de vidro larga e de um motor, durante 3 minutos, tal como descrito no capítulo IV (IV.2.1.1) para a preparação das amostras de glúten. Após hidratação, as concentrações finais de PHS nas amostras glúten + PHS foram de 0,5%, 2,5% e 5% (m/m), respectivamente para as concentrações 1%, 5% e 10% acima referidas. Por conveniência, prepararam-se amostras de 1,2 g para o estudo por reologia. Após a preparação, as amostras foram imediatamente transferidas para o reómetro.

V. 2.2.2. Preparação das amostras para o estudo por RMN

Para o estudo por RMN foram preparados sistemas glúten + PHS com 0,5% (m/m) de PHS originais. As amostras foram hidratadas a 50% (m/m) com água deuterada (D_2O), tendo em conta o teor de humidade do glúten e das PHS, e foram misturadas como descrito anteriormente. Por conveniência, prepararam-se amostras de 0,3 g para o estudo por RMN. Após a preparação, as amostras ficaram em repouso durante duas horas, tendo depois sido transferidas para o rotor para posterior análise.

V. 2.3. Caracterização reológica

A metodologia utilizada para o estudo do comportamento reológico dos sistemas de glúten+PHS foi igual à descrita para o glúten (§ IV.2.2). Todos os ensaios foram conduzidos na zona viscoelástica linear, a uma baixa amplitude de deformação (1% γ). Depois de colocada no reómetro, a amostra ficou em repouso durante 1 h antes de se iniciar qualquer tipo de teste, permitindo, assim, uma uniformização das condições para todas as amostras. Durante este tempo de repouso, a evolução da amostra foi seguida através de um ensaio de varrimento no tempo, a uma temperatura constante de 20°C e frequência constante de 0,5 Hz.

Os métodos reológicos utilizados foram os mesmos anteriormente descritos para o glúten.

V. 2.4. Caracterização por espectroscopia de RMN

As amostras de glúten + PHS foram caracterizadas por espectroscopia de ressonância magnética, tendo-se registado espectros de carbono (^{13}C -CP/MAS) e de protão (^1H -MAS). As condições de aquisição dos espectros foram as mesmas utilizadas para as amostras de glúten (§ IV.2.3). Os tempos de relaxação $T_{1\text{H}}$ e $T_{2\text{H}}$ foram obtidos seguindo a mesma metodologia descrita para o glúten (§ IV.2.3). Para as amostras de glúten + PHS os ensaios de temperatura foram realizados somente para temperaturas na gama 20-80°C.

V. 3. Resultados e Discussão

V. 3.1. Caracterização reológica das amostras de glúten + pentosanas hidrossolúveis

O efeito das PHS nas propriedades viscoelásticas do glúten foi avaliado em amostras hidratadas após preparação (temperatura ambiente - 20°C), ao longo de um tratamento térmico (20-80-20 °C), e novamente a 20 °C, após arrefecimento.

V. 3.1.1. Caracterização das amostras hidratadas à temperatura ambiente

Depois de colocadas no reómetro, as amostras ficaram em repouso durante 60 min, possibilitando o relaxamento de qualquer tensão residual. Durante este tempo, a evolução dos sistemas foi seguida através de um ensaio de varrimento no tempo, tendo-se verificado que todas as amostras apresentaram uma variação dos módulos viscoelásticos com o tempo praticamente desprezável, tal como se pode verificar na Figura 5.1.

Todas as amostras estudadas apresentaram valores do módulo de conservação (G') mais elevados do que os valores do módulo de perda (G''), mostrando um comportamento característico de materiais altamente estruturados.

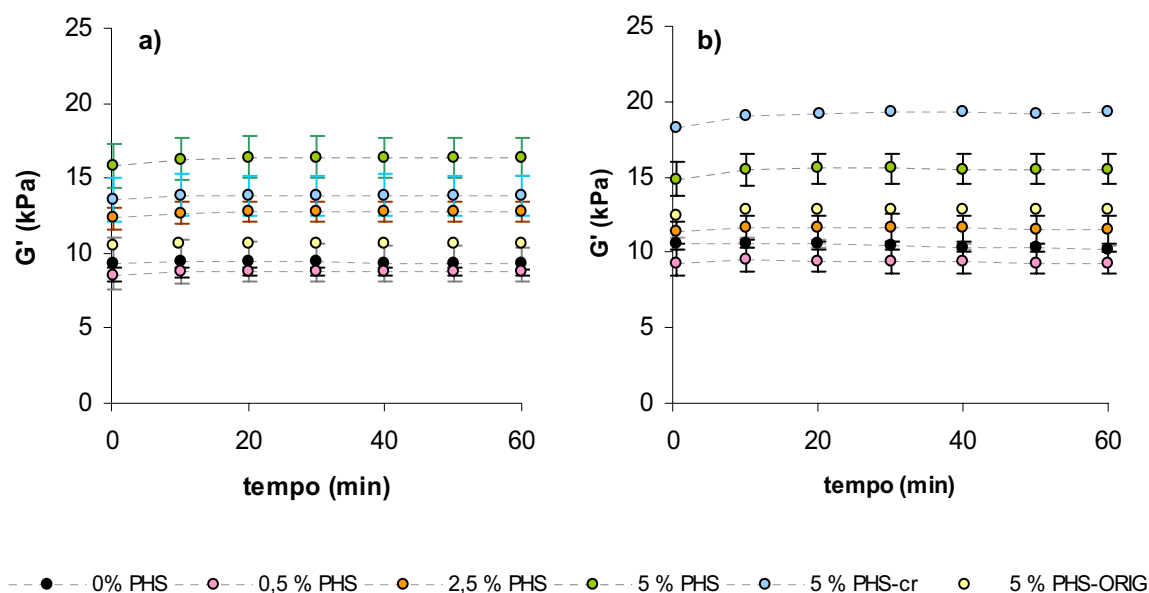


Figura 5.1 – Evolução do módulo de conservação (G') em função do tempo ($\gamma=1\%$, 20°C , $0,5\text{ Hz}$) para amostras de glúten (0% PHS) e glúten+PHS hidratadas a 50% (m/m), a diferentes concentrações de PHS (0,5 %, 2,5 % e 5 %), para as variedades a)- Amazonas e b)- Sorraia, após colocação das amostras no reómetro; PHS-cr representa amostras de glúten e PHS de variedades cruzadas; PHS-ORIG representa amostras de glúten + PHS originais (não purificadas)

Este comportamento não se desviou do esperado, tendo em conta o comportamento atrás já descrito (§ IV.3.1.2) para o principal componente da mistura, o glúten. A Figura 5.2 apresenta os valores de G' e G'' registados no final do tempo de repouso, de modo a facilitar a comparação dos valores dos módulos viscoelásticos entre as amostras analisadas.

A adição de 0,5% PHS não produziu efeito significativo nos valores dos módulos viscoelásticos (Figura 5.2), comparativamente à amostra de glúten isolado (sem PHS, i.e. 0% PHS). A adição de 2,5% e 5% de PHS ao glúten conduziu ao aumento dos valores de ambos os módulos viscoelásticos G' e G'' , no sentido directo do aumento da concentração. As PHS da variedade AMA apresentaram um efeito mais acentuado do que as PHS da variedade SOR, tal como se pode verificar pelo efeito do cruzamento de variedades. As amostras preparadas com PHS originais apresentaram valores dos módulos viscoelásticos mais baixos do que as respectivas amostras preparadas com PHS purificadas.

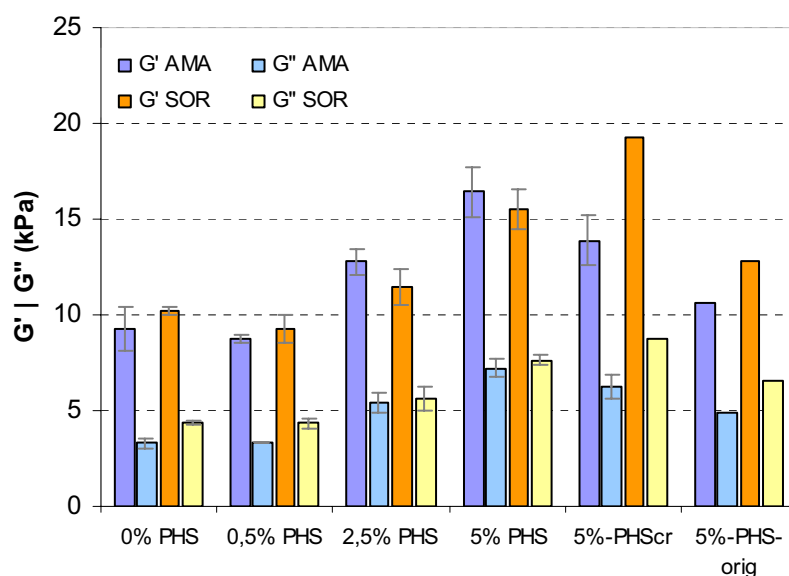


Figura 5.2 – Valores dos módulos G' e G'' registados após tempo de repouso de 60 minutos, para amostras de glúten (0% PHS) e glúten+PHS a diferentes concentrações de PHS (0,5%, 2,5% e 5%); PHS-cr representa amostras de glúten e PHS de variedades cruzadas: I- glúten AMA + 5 % PHS SOR, II- glúten SOR + 5 % PHS AMA; PHS-orig representa amostras de glúten + PHS originais (não purificadas)

O comportamento viscoelástico das amostras de glúten e glúten + PHS foi analisado através dos espectros mecânicos registados antes do aquecimento, os quais são apresentados na Figura 5.3. Na gama de frequências analisadas, tal como já observado para o glúten hidratado sem PHS, todos os sistemas apresentaram uma dependência dos módulos viscoelásticos face à frequência de oscilação, aumentando para frequências mais elevadas.

A adição de PHS contribuiu para a subida dos valores de G' , numa extensão diferente dependendo da variedade e da concentração das PHS. No entanto, apesar da adição de PHS contribuir para o aumento dos valores de G' , verifica-se um aumento do carácter viscoso do sistema o que é traduzido por um aumento dos valores de $\tan \delta$ com a adição de PHS. Estes resultados indicam que a introdução de PHS contribuiu para o aumento de processos dissipativos de energia, o que se traduziu no aumento implícito dos valores de G'' .

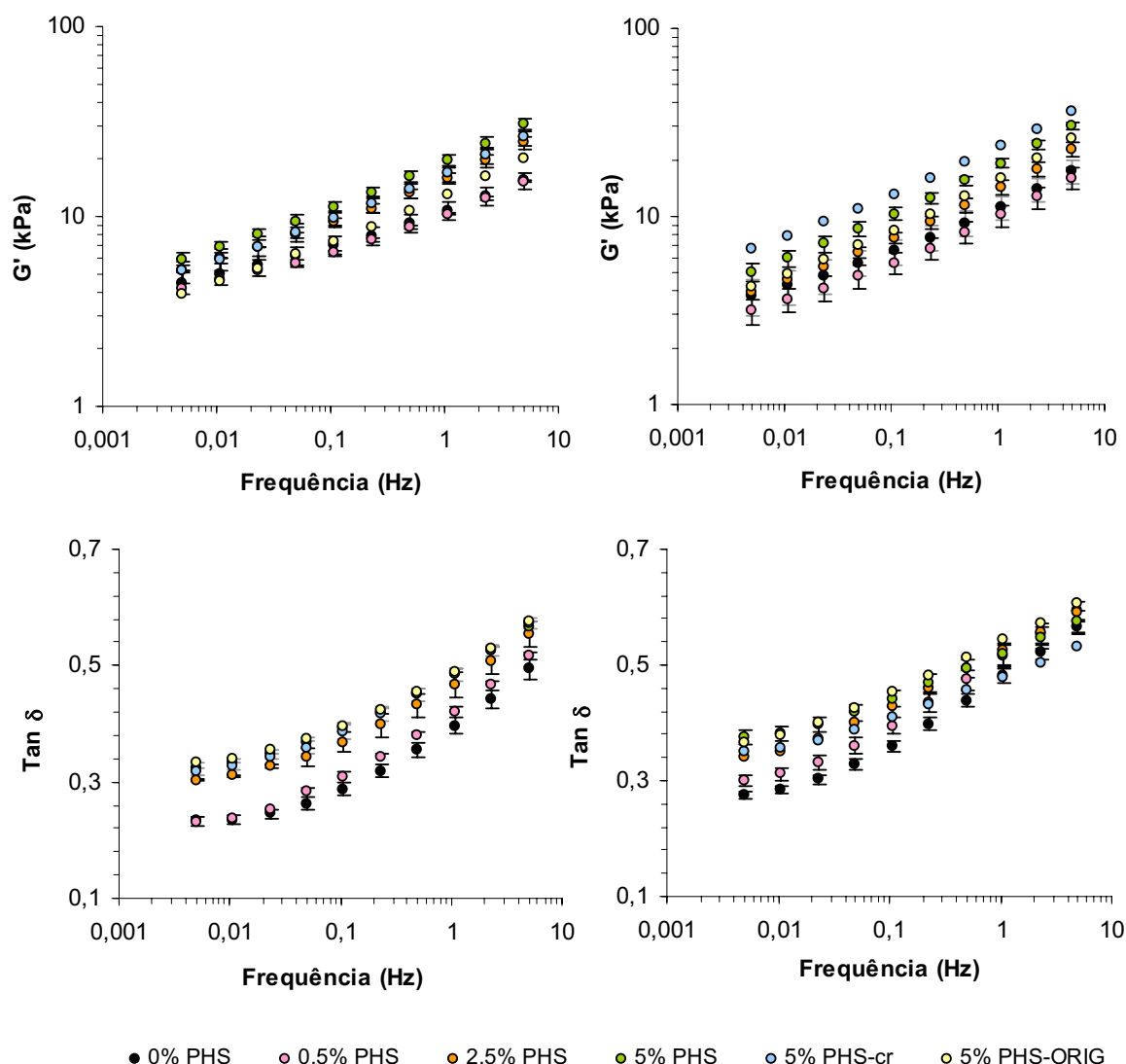


Figura 5.3 – Espectros mecânicos dos sistemas de glúten + pentosanas hidrossolúveis (50% H₂O m/m) para as variedades Amazonas e Sorraia adquiridos a 20°C, antes do tratamento térmico; variação do módulo de conservação, G' (em cima), e variação da tangente ao ângulo de perda, $\tan \delta$ (em baixo), com a frequência de oscilação.

Tal como observado para os sistemas isolados de glúten (0% PHS), $\tan \delta$ aumentou com a frequência o que indica que, para a mesma gama de frequências analisadas, o módulo G'' aumentou mais do que o módulo G' , o que significa que há uma maior dissipação de energia para frequências mais elevadas. Para frequências mais baixas, $\tan \delta$ apresentou um plateau, um comportamento igualmente observado para as amostras de glúten.

Para ambas as variedades, a adição de 0,5% de PHS teve um efeito quase imperceptível nas propriedades viscoelásticas das amostras de glúten. No caso da variedade AMA, verificou-se um aumento dos valores de G' mais evidente com o aumento da concentração de PHS para as concentrações de 2,5% e 5%, embora para estes sistemas os valores de $\tan \delta$ tenham sido semelhantes. Para esta variedade, todos os sistemas apresentaram um perfil viscoelástico bastante similar. No caso da variedade SOR, assinala-se o efeito mais saliente para os sistemas com 5% de PHS, sobretudo para o sistema de combinação cruzada. A adição de 5% de PHS da variedade AMA ao glúten da variedade SOR reflectiu-se num aumento bastante mais acentuado dos valores de G' , bem como numa diminuição do carácter viscoso (diminuição dos valores de $\tan \delta$). Para esta variedade, todos os sistemas apresentaram igualmente um perfil viscoelástico semelhante, à excepção do sistema de combinação cruzada que apresentou um ligeiro desvio à tendência apresentada pelos restantes sistemas, como resultado da diminuição dos valores do módulo G'' (diminuição dos valores de $\tan \delta$) observada para este sistema.

Relativamente aos outros sistemas com 5% PHS, os sistemas com 5% PHS-orig (PHS não purificadas) apresentaram valores de G' mais baixos e valores de $\tan \delta$ mais elevados, ou seja um carácter viscoso mais acentuado, o que sugere um efeito apreciável das proteínas associadas à fracção de PHS.

Tal como já foi referido, as pentosanas hidrossolúveis possuem a capacidade de imobilizarem a água, formando soluções bastante viscosas ou géis (Jelaca e Hlynka, 1971; Patil *et al.*, 1975; Hoseney, 1984; Izydorczyk *et al.*, 1990, 1991; Rouau e Moreau, 1993). A adição de PHS ao glúten e a manifestação destes atributos após a hidratação do sistema poderá reflectir-se na alteração não só das propriedades funcionais como também na própria formação do glúten. A elevada capacidade de retenção de água exibida pelas PHS deverá afectar a disponibilidade da água necessária para a formação da rede de glúten, observando-se por isso uma variação nas suas propriedades reológicas. O aumento dos valores de G' poderá estar relacionado com a menor disponibilidade de água para plastificar o glúten. O preenchimento da matriz proteica pela solução viscosa formada durante hidratação das PHS será o responsável pelo carácter viscoso mais acentuado. De acordo com os resultados apresentados, verifica-se que a interacção glúten-PHS parece ser diferente entre as duas variedades. Este facto

poderá estar relacionado com uma diferente afinidade das PHS pela água, com a diferente estrutura das PHS ou ainda, possivelmente, com a diferente composição em ácido ferúlico. O ácido ferúlico está envolvido na gelificação oxidativa de soluções de PHS (Izydorczyk *et al.*, 1990; Moore *et al.*, 1990; Vinkx *et al.*, 1991; Figueroa-Espinoza *et al.*, 1999). Foi reportado por outros autores que uma combinação do género arabinoxilanas-ácido ferúlico-cisteínas poderá estar por trás da interacção PHS-glúten (Geissmann e Neukom, 1973; Oudgenoeg *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002). A interacção entre PHS e proteína residual é reconhecida. A presença de proteínas residuais na fracção de PHS favorece a gelificação oxidativa (Udy, 1965) através da interacção ácido-ferúlico-cisteínas. Alguns autores referiram que o tratamento de géis de PHS com enzimas proteolíticas resulta na liquefacção dos géis (Neukom *et al.*, 1962; Girhammar e Nair, 1995). É possível que a interacção entre as PHS e o glúten tenha por base um mecanismo semelhante ao das interacções PHS-proteína hidrossolúvel.

O diferente comportamento das PHS poderá também estar relacionado com a diferente razão arabinose/xilose apresentada pelas PHS. Uma baixa razão está associada a um baixo grau de ramificação, e pentosanas com um baixo grau de ramificação apresentam menor capacidade de interacção do que as de maior grau de ramificação (Ciacco e D'Appolonia, 1982). As PHS provenientes da variedade AMA apresentaram uma razão arabinose/xilose (0,74) mais elevada comparativamente às PHS da variedade SOR (0,67). Este resultado sugere que as PHS AMA poderão estar envolvidas num maior número de interacções com o glúten. Patil *et al.* (1975), sugeriram que as PHS apresentam um papel activo na formação de ligações de hidrogénio com os grupos –NH das proteínas do glúten. Um maior grau de ramificação por parte das PHS disponibiliza um maior número de “grupos” –H com potencial para o estabelecimento de interacções não-covalentes, nomeadamente pontes de hidrogénio, formando assim uma densa rede de ligações.

V. 3.1.2. Caracterização das amostras durante aquecimento/arrefecimento

O efeito das PHS nas alterações viscoelásticas que ocorrem durante o tratamento térmico do glúten foi estudado através do aquecimento de amostras glúten+PHS desde 20°C até 80°C e posterior arrefecimento até 20°C. A Figura 5.4 apresenta a evolução dos

módulos de conservação (G') e de perda (G'') durante o ciclo de aquecimento/arrefecimento (20-80-20°C), para as duas variedades, AMA e SOR.

Todos os sistemas apresentaram um comportamento com um perfil qualitativamente semelhante ao perfil do comportamento do glúten, apenas se observando algumas modificações durante a descida da temperatura, relativamente ao módulo de conservação. Tal como observado para o glúten, durante o aquecimento observou-se uma diminuição dos valores de G' até cerca de 60°C, seguindo-se depois um ligeiro aumento dos valores até 80°C. Com o arrefecimento, os valores de G' aumentaram gradualmente de uma forma não uniforme, não recuperando o perfil registado durante o aquecimento. No caso das amostras com PHS, contrariamente ao observado para as amostras de glúten isolado, verificou-se uma tendência para a convergência dos valores a 20°C, numa amplitude dependente da concentração e da variedade de PHS.

O módulo de perda apresentou um comportamento bastante distinto do módulo de conservação, apresentando um comportamento reversível ao longo de toda a gama de temperaturas analisada, sugerindo que o tratamento térmico apenas terá exercido efeito sobre o carácter elástico dos sistemas, um resultado igualmente observado para as amostras de glúten.

A adição de 0,5% de PHS não produziu alterações significativas no comportamento do glúten da variedade AMA. No caso do glúten da variedade SOR, o efeito da adição de 0,5% PHS parece traduzir-se num estreitamento da diferença dos valores do módulo G' entre o aquecimento e o arrefecimento, sugerindo uma tendência para a reversibilidade do comportamento reológico. Para esta variedade verifica-se que o estreitamento da diferença dos valores de G' e a tendência para a reversibilidade do comportamento reológico ocorrem para todas as amostras com PHS numa extensão tanto maior quanto maior a quantidade de PHS adicionadas.

No caso da variedade AMA, a tendência observada é semelhante, excepto para a amostra com 5% PHS. A adição de 5% PHS de AMA ao glúten da mesma variedade reflectiu-se num alargamento da diferença dos valores do módulo viscoelástico, sobretudo no intervalo entre 80°C e 40°C. No entanto, é observada a tendência para a convergência dos valores a 20°C.

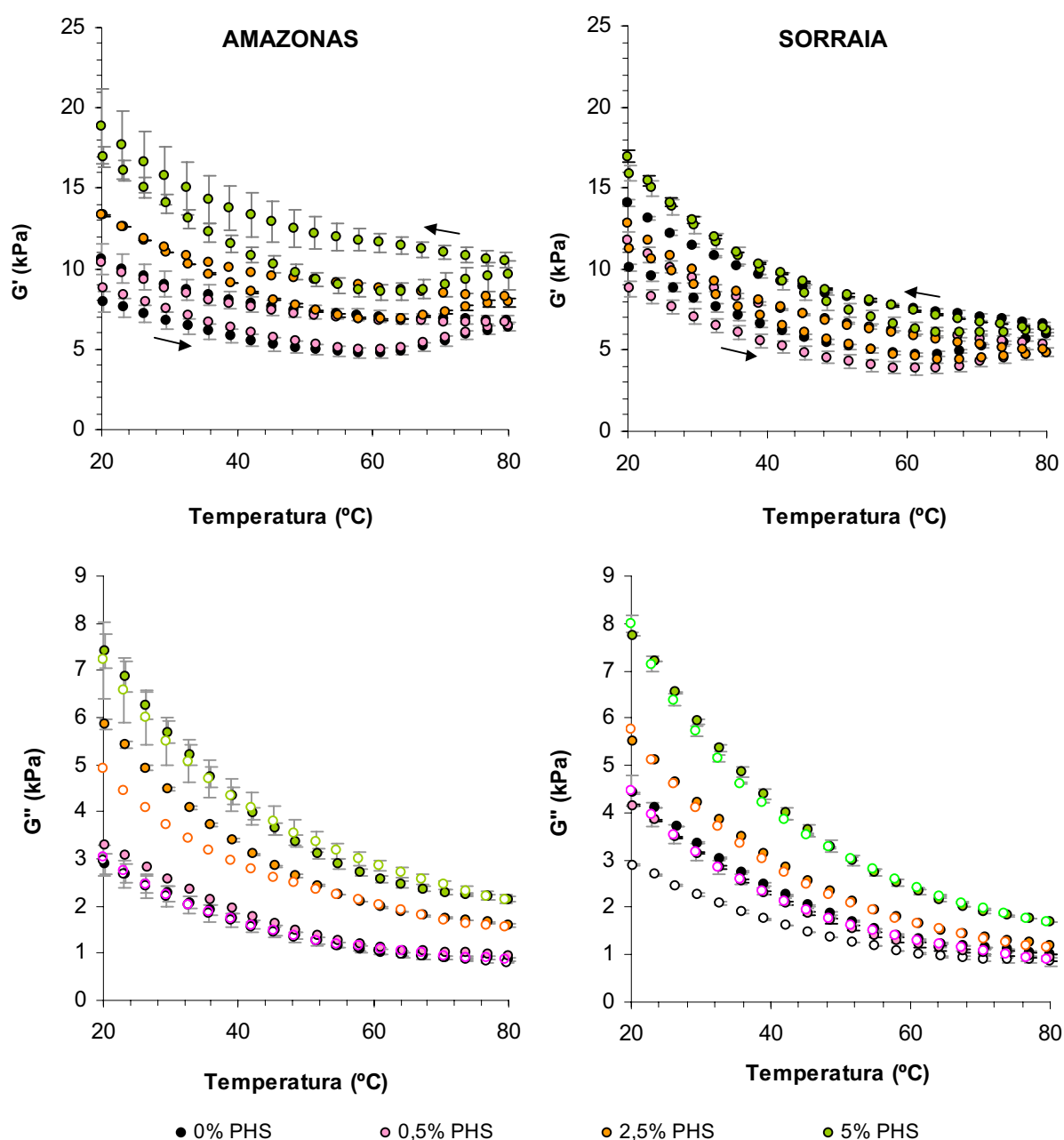


Figura 5.4 -Evolução dos módulos de conservação (G' ; em cima) e de perda (G'' ; em baixo) dos sistemas de glúten + pentosanas hidrossolúveis (50% H_2O m/m) das variedades Amazonas e Sorraia, durante aquecimento (20-80°C; 1°C/min) e arrefecimento (80-20°C; 1°C/min), após 10 min a 80°C. Para facilitar a identificação das diferentes curvas, nos gráficos que apresentam a variação do módulo de G'' com a temperatura, os símbolos abertos representam as curvas adquiridas durante a descida da temperatura (80-20°C), e são correspondentes às curvas com os símbolos a cheio da mesma cor (20-80°C).

O efeito da variedade de PHS bem como o efeito das PHS originais (não purificadas) ao longo do tratamento térmico, é apresentado na Figura 5.5 para amostras de glúten + 5% PHS. A adição de PHS de uma variedade ao glúten da outra variedade (amostras PHS-cr) conduziu a comportamentos diferentes.

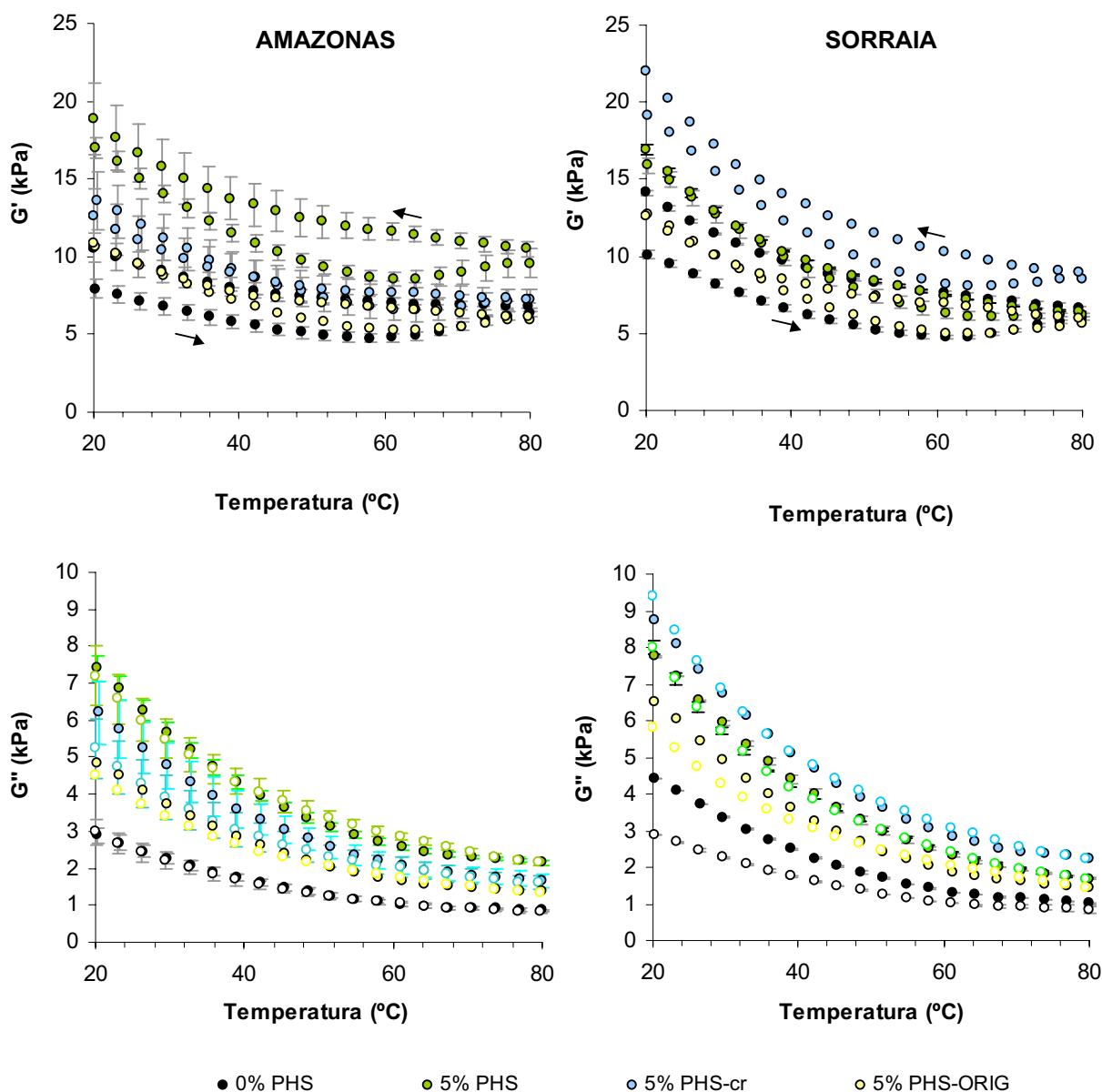


Figura 5.5 - Efeito da variedade de PHS e das PHS originais na evolução dos módulos de conservação (G' ; em cima) e de perda (G'' ; em baixo) dos sistemas de glúten + 5% pentosanas hidrossolúveis (50% H_2O m/m) das variedades Amazonas e Sorraia, durante o aquecimento (20-80°C; 1°C/min) e o arrefecimento (80-20°C; 1°C/min)

A adição de PHS da variedade SOR ao glúten da variedade AMA resultou numa diminuição dos valores de G' relativamente ao sistema com PHS da mesma variedade, bem como numa menor diferença dos valores de G' entre o aquecimento e o arrefecimento. O comportamento e os valores do módulo de perda não sofreram alterações significativas. A adição de PHS da variedade AMA ao glúten da variedade SOR resultou num aumento bastante mais acentuado dos módulos de G' relativamente ao sistema com PHS da mesma variedade, observando-se um alargamento da diferença dos valores de G' entre o aquecimento e o arrefecimento.

A adição de 5% de PHS não purificadas (PHS-orig) apresentou um efeito distinto relativamente ao respectivo sistema com PHS purificadas. No caso da variedade AMA, a adição de PHS-orig resultou num estreitamento da diferença dos valores de G' entre o aquecimento e o arrefecimento, enquanto que no caso da variedade SOR foi observada uma maior diferença. Em ambas as variedades, os sistemas de glúten+PHS-orig apresentaram valores mais baixos quer do módulo de conservação, quer do módulo de perda.

Tal como já referido, durante o aquecimento verificou-se a diminuição dos valores de G' até um valor mínimo (G'_{\min}), ponto a partir do qual os valores de G' voltaram a subir. A diminuição dos valores de G' até uma determinada temperatura ($T_{G'_{\min}}$) parece reflectir alguma perda da estrutura da matriz proteica devido ao aquecimento do sistema. A perda de estrutura dos sistemas pode ser ilustrada pela quebra de estrutura relativa (QE) definida por:

$$QE = (G'_o - G'_{\min}) / G'_o \quad \text{eq. 5.1}$$

onde G'_o representa o primeiro valor de G' registado no início do aquecimento.

A Tabela 5.1 apresenta os valores de G'_{\min} , a temperatura à qual se atingiu o valor mínimo de G' ($T_{G'_{\min}}$) bem como os valores de QE para os sistemas de glúten e glúten+PHS.

O valor de G'_{\min} , variou quer entre as duas variedades, quer entre a quantidade de PHS adicionada. A adição de PHS reflectiu-se no aumento sucessivo dos valores de G'_{\min} , tendo este efeito sido mais pronunciado no caso das amostras da variedade AMA. Para ambas as variedades, a adição de 0,5% de PHS não alterou significativamente o valor de

$T_{G'_{min}}$, observando-se uma deslocação da $T_{G'_{min}}$ para valores mais elevados, para as amostras com 2,5% e 5% de PHS. A $T_{G'_{min}}$ corresponde à temperatura a partir da qual ocorrem alterações irreversíveis, associadas à desnaturação e formação de interações intermoleculares responsáveis pelo aumento de G' . A deslocação da $T_{G'_{min}}$ para valores superiores na presença de PHS sugere que as PHS contribuem para uma matriz mais resistente às alterações induzidas pelo aquecimento.

Tabela 5.1 - Valores^a de G'_{min} (G'_{min}), $T_{G'_{min}}$ ^b e quebra de estrutura relativa para amostras de glúten (0% PHS) e glúten+PHS a diferentes concentrações de PHS (0,5%, 2,5% e 5%).

	% PHS (m/m)					
	0 %	0,5 %	2,5 %	5 %	5 % PHS-cr ^d	5 % PHS-orig ^e
Glúten SORRAIA						
G'_{min} (kPa)	4,74 ± 0,14	3,84 ± 0,33	4,44 ± 0,12	6,05 ± 0,24	8,03 ± 0,54	4,93 ± 0,42
$T_{G'_{min}}$ (°C)	60,7 ± 0,9	61,2 ± 0,1	65,9 ± 2,3	69,1 ± 2,3	67,5 ± 0,1	64,3 ± 0,1
QE ^c	0,530 ± 0,001	0,563 ± 0,014	0,607 ± 0,002	0,619 ± 0,003	0,581 ± 0,022	0,612 ± 0,013
Glúten AMAZONAS						
G'_{min} (kPa)	4,76 ± 0,32	4,98 ± 0,12	6,85 ± 0,02	8,55 ± 0,45	6,57 ± 0,72	5,24 ± 0,21
$T_{G'_{min}}$ (°C)	59,4 ± 1,7	58,0 ± 0,1	61,2 ± 0,1	62,8 ± 2,2	64,4 ± 0,1	64,3 ± 0,1
QE ^c	0,400 ± 0,008	0,434 ± 0,002	0,485 ± 0,003	0,454 ± 0,117	0,520 ± 0,010	0,507 ± 0,010

^a Média ± (desvio padrão) de três ensaios

^b Temperatura à qual se verificou G'_{min}

^c Quebra de estrutura relativa devido ao aquecimento até $T_{G'_{min}}$

^d Amostras de glúten e PHS de variedades cruzadas: glúten SOR+PHS AMA e glúten AMA+PHS SOR

^e Amostras de glúten + PHS originais (não purificadas)

A adição de PHS da variedade SOR ao glúten da variedade AMA conduziu a uma diminuição do valor de G'_{min} bem como a um aumento do valor de $T_{G'_{min}}$, comparativamente ao sistema de variedades não cruzadas. Por sua vez, a adição de PHS da variedade AMA ao glúten da variedade SOR manifestou-se apenas na subida do valor de G'_{min} .

Os sistemas de glúten + PHS-orig de ambas as variedades apresentaram valores iguais de $T_{G'_{min}}$, tendo os valores de G'_{min} sido também bastante próximos entre as variedades.

A quebra de estrutura foi maior na presença de PHS, aumentando com a maior quantidade de PHS. Este facto poderá estar relacionado com o aumento do carácter viscoso devido à gelificação das PHS presentes, paralelamente ao enfraquecimento das ligações que participam na formação da estrutura do glúten.

V. 3.1.3. Comportamento viscoelástico após aquecimento

No sentido de analisar o efeito das PHS no comportamento viscoelástico do glúten após aquecimento/arrefecimento, efectuaram-se ensaios de varrimento de frequência após as amostras sofrerem o ciclo de aquecimento/arrefecimento (20-80-20°C) e atingirem de novo 20°C. A Figura 5.6 apresenta os espectros mecânicos adquiridos após o ciclo de aquecimento/arrefecimento (20-80-20°C), apresentando a variação do módulo de conservação e da tangente de perda em função da frequência.

Os valores registados após o arrefecimento foram ligeiramente superiores aos valores registados antes do ciclo de aquecimento/arrefecimento (ver Figura 5.3 para comparação de valores). Este resultado era já de certo modo previsto tendo em conta a aproximação dos valores finais (após o arrefecimento) de G' dos valores iniciais (antes do aquecimento), registados a 20°C.

Os sistemas glúten+PHS manifestaram um comportamento qualitativamente semelhante à amostra de glúten isolado, apresentando valores do módulo G' ligeiramente superiores aos respectivos valores observados para o glúten. Uma diferença ligeiramente mais pronunciada dos valores de G' é observada para o sistema de combinação cruzada glúten SOR + PHS AMA, salientando mais uma vez o efeito mais marcante das PHS da variedade AMA.

Os valores de $\tan \delta$ não sofreram grande variação após o ciclo de aquecimento/arrefecimento, tendo-se observado mais uma vez valores de $\tan \delta$ inferiores à unidade. A adição de PHS continua a evidenciar um carácter mais viscoso manifestado pela subida dos valores de $\tan \delta$, numa extensão dependente da quantidade de PHS. Continua-se ainda a observar uma subida dos valores de $\tan \delta$ para frequências mais elevadas, sublinhando um aumento mais significativo da componente viscosa para frequências mais elevadas. O aumento do carácter viscoso dos sistemas devido à adição das PHS poderá ter impedido o desenvolvimento de uma matriz mais elástica após o ciclo de aquecimento/ arrefecimento dos sistemas.

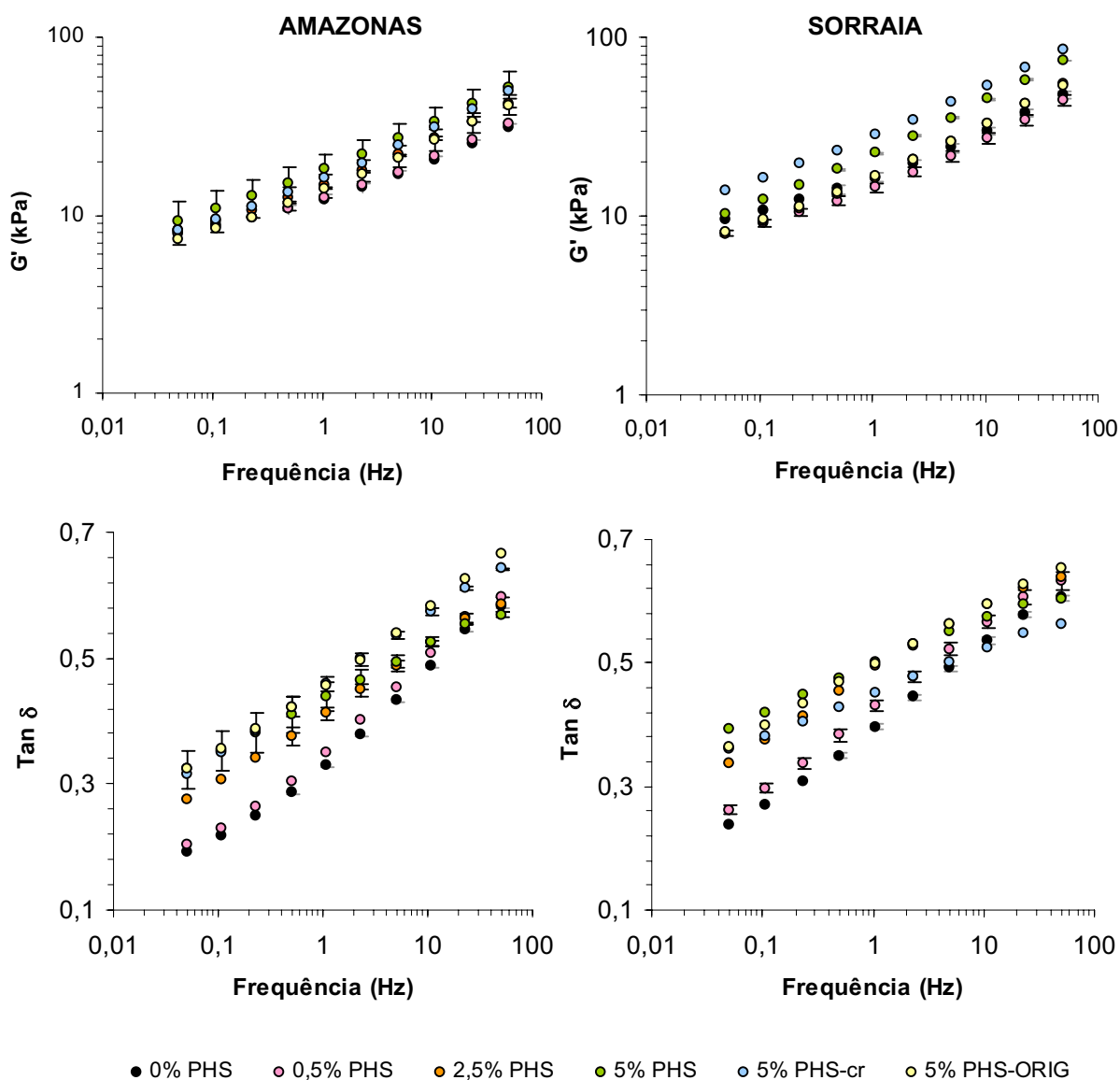


Figura 5.6 - Comportamento viscoelástico dos sistemas de glúten + pentosanas hidrossolúveis (50% H_2O m/m) para as variedades Amazonas e Sorraia adquiridos a 20°C, depois do tratamento térmico (20-80-20°C); variação do módulo de conservação, G' (em cima), e variação da tangente ao ângulo de perda, $\tan \delta$ (em baixo), com a frequência de oscilação.

V. 3.2. Caracterização por RMN do estado sólido

A caracterização das amostras de glúten + PHS foi complementada através de estudos de espectroscopia de RMN. Para tal foram realizados ensaios numa amostra constituída por glúten + 0,5% (m/m) de PHS da variedade SOR, hidratada a 50% (m/m) com D₂O, registando-se espectros de ¹³C-CP/MAS e espectros de ¹H-MAS. A mistura glúten + PHS foi ainda sujeita a um tratamento térmico e o seu comportamento foi comparado com o dos sistemas isolados de glúten. Apenas foram realizados ensaios para a variedade SOR, com o objectivo de avaliar o efeito das PHS no comportamento do glúten, independentemente da variedade.

Os espectros de ¹³C-CP/MAS registados para a mistura glúten + 0,5% PHS foram bastante semelhantes aos registados para o glúten isolado, apresentando os picos característicos do glúten e do amido residual presente no glúten. Não se conseguiram discriminar os sinais característicos das PHS, dada a pequena percentagem de PHS na mistura.

Dada a semelhança encontrada entre os espectros de ¹³C-CP/MAS dos sistemas de glúten isolado e de glúten + 0,5% PHS, nesta secção apenas será discutido o efeito das PHS no comportamento das amostras ao nível do protão, bem como nos tempos de relaxação longitudinal (T_{1H}) e transversal (T_{2H}).

V. 3.2.1. Caracterização por ¹H-MAS

V. 3.2.1.1. Caracterização da amostra gluten+ 0,5 % PHS à temperatura ambiente

À temperatura ambiente, as amostras de glúten + 0,5 % PHS apresentaram um espectro de ¹H-MAS com um perfil idêntico ao obtido para o sistema isolado de glúten, tal como se pode observar na Figura 5.7 que apresenta os espectros de ¹H-MAS dos sistemas de glúten isolado e glúten + 0,5% PHS para a variedade SOR. Ambos os sistemas apresentam sinais comuns, derivados essencialmente da matriz proteica, o principal componente da mistura. As atribuições dos sinais observados na Figura 5.7 encontram-se na Tabela 5.2 e foram baseadas em trabalhos publicados anteriormente (Wüthrich, 1986; Gil *et al.*, 1997a,b; Sacco *et al.*, 1998; Alberti, 2000) bem como no trabalho desenvolvido no capítulo anterior.

A 4,8 ppm observa-se o sinal dominante atribuído à água (HOD). Entre 0 e 3 ppm surge a contribuição das ressonâncias alifáticas provenientes da proteína e de lípidos. A 4,1 ppm observa-se um ombro resultante dos prótons alfa da proteína e de algum amido residual, tal como observado anteriormente para o espectro ^1H -MAS do glúten. Neste espectro é difícil discriminar a contribuição das PHS, dada a baixa quantidade de PHS adicionadas relativamente à quantidade de glúten. Porém, as PHS deverão ter uma contribuição sobreposta com a contribuição do amido, a 4,1 ppm e a 5,3 ppm. Na região de 6-9 ppm observa-se a contribuição dos aminoácidos aromáticos sobrepostos com a contribuição dos prótons amídicos.

Comparando os espectros da Figura 5.7 é visível alguma perda de resolução em todo o espectro ^1H -MAS da amostra de glúten + 0,5% PHS, o que poderá estar relacionado com uma possível diminuição da mobilidade ou, alternativamente, a uma maior dispersão de desvio químico.

O efeito da adição de PHS na amostra de glúten pode ser melhor seguido através da dinâmica de relaxação do próton. Para a amostra de glúten + 0,5% PHS foram registados os tempos de relaxação $T_{1\text{H}}$ e $T_{2\text{H}}$ para os vários picos visíveis, à temperatura ambiente (20°C – antes do aquecimento). Os valores de $T_{1\text{H}}$ e $T_{2\text{H}}$ das amostras de glúten + 0,5% PHS foram comparados com os respectivos valores dos tempos de relaxação registados para a amostra de glúten isolado, tal como é apresentado nas Tabelas 5.2 e 5.3

De acordo com os valores apresentados na Tabela 5.2 verifica-se que a adição de 0,5% de PHS à amostra de glúten promoveu a diminuição dos valores de $T_{1\text{H}}$, o que poderá indicar um aumento de mobilidade, caso os valores de $T_{1\text{H}}$ se encontrem no lado dos tempos de correlação mais longos da curva de $T_{1\text{H}}$ (ver § I.2.2.3.1) ou uma diminuição da mobilidade, caso os valores de $T_{1\text{H}}$ se encontrem no lado dos tempos de correlação mais curtos. Porém, os valores de $T_{2\text{H}}$ apresentados na Tabela 5.3 mostram que a adição de 0,5% de PHS conduziu à diminuição dos valores de $T_{2\text{H}}$ (sentido do alongamento dos tempos de correlação), pelo que na interpretação da diminuição dos valores de $T_{1\text{H}}$ observada para a amostra de glúten + 0,5% PHS, dever-se-á então considerar a diminuição da mobilidade dos componentes em geral.

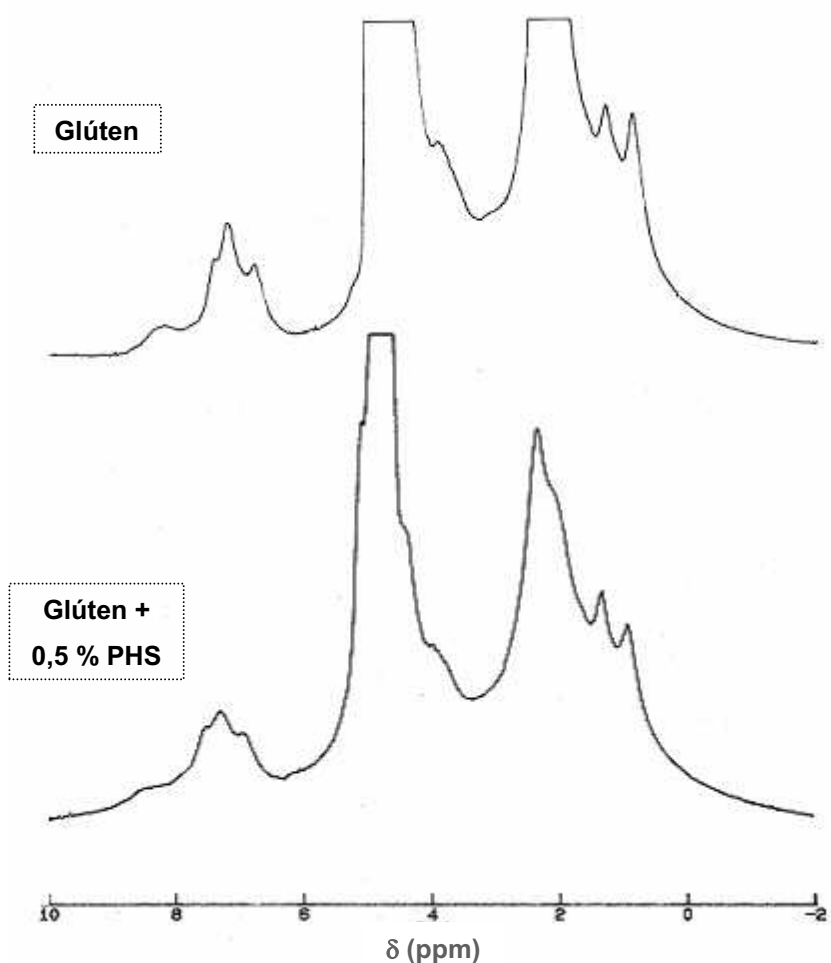


Figura 5.7 - Espectros ¹H-MAS de glúten (em cima) e mistura glúten + 0,5% (m/m) de pentosanas hidrossolúveis (em baixo) da variedade SOR, hidratados (50% D₂O m/m), 10kHz, ns=40.

Na amostra de glúten + 0,5% PHS, verifica-se que todos os ambientes proteicos (2,1-2,4 ppm e 6,9-7,5 ppm) são caracterizados por valores de T_{1H} (Tabela 5.2) na ordem dos 0,54-0,55 s. Comparativamente à amostra de glúten isolado, verifica-se que a amostra com 0,5% de PHS apresentou uma comunicação de spin mais eficiente entre todos os componentes proteicos (maior proximidade dos componentes), dada a proximidade dos valores de T_{1H} observada. Na amostra de glúten isolado os grupos proteicos alifáticos apresentaram alguma separação dos restantes grupos amídicos uma vez que ambos os grupos apresentaram valores de T_{1H} um pouco diferentes.

Na amostra de glúten + 0,5% PHS, a água (4,8 ppm) apresentou um valor de T_{1H} mais baixo do que o valor registado para a amostra de glúten, o que indica a alteração do ambiente em torno da água por efeito da adição de PHS. Dada a diminuição dos valores de T_{1H} verificada para todos os componentes em geral na amostra de glúten + 0,5% PHS, o menor valor de T_{1H} apresentado pela água nesta amostra, relativamente ao valor apresentado na amostra de glúten, parece indicar que a água se encontra mais imobilizada devido à presença de PHS.

Tabela 5.2 - Valores dos tempos de relaxação longitudinal – T_{1H} – para as amostras de glúten e glúten + 0,5% PHS da variedade Sorraia, hidratadas a 50% (m/m), à temperatura ambiente. As atribuições dos sinais foram feitas com base em trabalhos publicados anteriormente (Wüthrich, 1986; Gil *et al.*, 1997a,b; Sacco *et al.*, 1998; Alberti, 2000)

δ / ppm	Atribuição		Glúten	Glúten + 0,5% PHS
1,2	CH_3 -	Lípidos residuais + Proteína	$0,774 \pm 0,007$	$0,494 \pm 0,005$
2,1	$-\text{CH}_2$ -	Proteína + Lípidos residuais	$0,649 \pm 0,005$	$0,543 \pm 0,008$
2,4	$-\text{CH}_2$ -		$0,661 \pm 0,004$	$0,541 \pm 0,008$
4,1	$-\text{CH}$	Proteína + Amido residual + PHS	$0,646 \pm 0,022$	$0,552 \pm 0,007$
4,8	HOD	Água	$0,592 \pm 0,009$	$0,468 \pm 0,012$
5,1	$-\text{CHO}$	Amido residual + PHS	n.d.	n.d.
6,9	$-\text{NH}_2$ aromáticos	Proteína	$0,776 \pm 0,018$	$0,537 \pm 0,009$
7,3	$-\text{NH}_2$ aromáticos		$0,743 \pm 0,018$	$0,545 \pm 0,016$
7,5	$-\text{NH}_2$		$0,782 \pm 0,019$	$0,551 \pm 0,010$
8,3	$-\text{NH}$		N.D.	$0,498 \pm 0,014$

n.d. – não detectável; N.D. – não determinável

Os valores de T_{2H} apresentados na Tabela 5.3 mostram que a adição de PHS à amostra de glúten originou uma maior homogeneidade da amostra em termos da mobilidade dos

seus componentes, dado que os valores de T_{2H} apresentaram apenas um componente, contrariamente ao observado para a amostra de glúten isolado. A mobilidade mais homogênea poderá estar relacionada com uma melhor distribuição da água em toda a amostra e com a formação de uma matriz mais viscosa devido à gelificação das PHS.

Tabela 5.3 - Valores dos tempos de relaxação transversal – T_{2H} – para as amostras de glúten e glúten + 0,5% PHS da variedades Sorraia, hidratadas a 50% (m/m), à temperatura ambiente.

δ ppm	Atribuição	Glúten			Glúten + 0,5% PHS		
		T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% prótons móveis (T_{2B})	T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% prótons móveis (T_{2B})
1,2	CH_3 -	0.524 ± 0.112	4.62 ± 0.79	47	$0,383 \pm 0,015$	-	-
2,1	$-\text{CH}_2-$	N.D.	N.D.	N.D.	$0,441 \pm 0,023$	-	-
2,4	$-\text{CH}_2-$	0.639 ± 0.191	4.04 ± 0.85	52	$0,502 \pm 0,035$	-	-
4,1	$-\text{CH}$	0.534 ± 0.184	4.34 ± 0.96	53	$0,530 \pm 0,045$	-	-
4,8	HOD	1.94 ± 0.53	5.16 ± 0.85	78	$1,55 \pm 0,32$	-	-
5,1	$-\text{CHO}$	-	-	-	-	-	-
6,9	$-\text{NH}_2$ aromáticos	0.398 ± 0.131	4.45 ± 0.60	13	$0,448 \pm 0,038$	-	-
7,3	$-\text{NH}_2$ aromáticos	0.676 ± 0.123	3.97 ± 0.56	51	$0,463 \pm 0,053$	-	-
7,5	$-\text{NH}_2$	0.765 ± 0.135	6.51 ± 1.05	48	$0,491 \pm 0,037$	-	-
8,3	$-\text{NH}$	0.289 ± 0.012	-	-	$0,273 \pm 0,023$	-	-

Na amostra de glúten + 0,5% PHS, a água apresentou-se como o componente mais móvel, com um valor de T_{2H} mais elevado do que os restantes componentes da amostra. Comparativamente à amostra de glúten, a água parece estar mais imobilizada na amostra de glúten + 0,5%PHS, o que está de acordo com os resultados de T_{1H} .

V. 3.2.1.2. Efeito do tratamento térmico 20-80-20°C

As amostras de glúten + 0,5% PHS foram sujeitas a um tratamento térmico e o seu comportamento foi seguido a várias temperaturas, na gama 20-80-20°C, através da aquisição de espectros de ^1H -MAS (Figura 5.8) e dos tempos de relaxação $T_{1\text{H}}$ e $T_{2\text{H}}$.

À semelhança do observado para o sistema de glúten isolado (ver § IV.3.1.3) com o aquecimento (Figura 5.8) é observado um aumento generalizado da resolução de todo o espectro, o que indica a promoção de uma maior mobilização de todos os componentes do sistema.

Os valores de $T_{1\text{H}}$ e $T_{2\text{H}}$ registados para a mistura glúten + 0,5% (m/m) de PHS estão apresentados, respectivamente, nas Tabelas 5.4 e 5.5, onde se apresentam os valores determinados para as temperaturas 20°C (antes do aquecimento), 80°C e 20°C (depois tratamento térmico). Os valores de $T_{1\text{H}}$ e $T_{2\text{H}}$ registados à temperatura inicial (amostra caracterizada à temperatura ambiente) são apresentados novamente de modo a facilitar a comparação dos resultados.

Com o aquecimento até 80°C, verifica-se um aumento dos valores de $T_{1\text{H}}$ (Tabela 5.4) para todos os componentes da amostra, sugerindo um aumento da mobilidade do sistema pela diminuição dos tempos de correlação. Este aumento de mobilidade é confirmado pelo aumento dos valores de $T_{2\text{H}}$, tal como será posteriormente discutido ao longo deste capítulo. Os valores de $T_{1\text{H}}$ apresentados pela amostra de glúten + 0,5% PHS são bastante semelhantes aos registados pela amostra de glúten isolado a 80°C (Tabela 4.8, § IV.3.2.4.1). Comparando a variação dos valores de $T_{1\text{H}}$ entre as duas amostras, verifica-se que o acréscimo em mobilidade, por efeito da temperatura, foi mais acentuado na amostra com 0,5% de PHS do que na amostra sem PHS.

Na amostra de glúten + 0,5% PHS aquecida até 80°C, verifica-se agora alguma separação dos valores de $T_{1\text{H}}$. Os prótons alifáticos (2,1-2,4 ppm) apresentaram valores de $T_{1\text{H}}$ mais baixos do que os prótons $-\text{NH}$ e $-\text{NH}_2$ (6,9-8,3 ppm) o que sugere uma maior imobilização dos prótons das cadeias alifáticas laterais relativamente aos prótons $-\text{NH}$ de cadeia central e aos prótons $-\text{NH}_2$ aromáticos e de cadeia lateral, sugerindo a ocorrência de alguma agregação na matriz do glúten. Este efeito foi igualmente observado para o glúten isolado (§ III.3.2.4, Tabela 4.8).

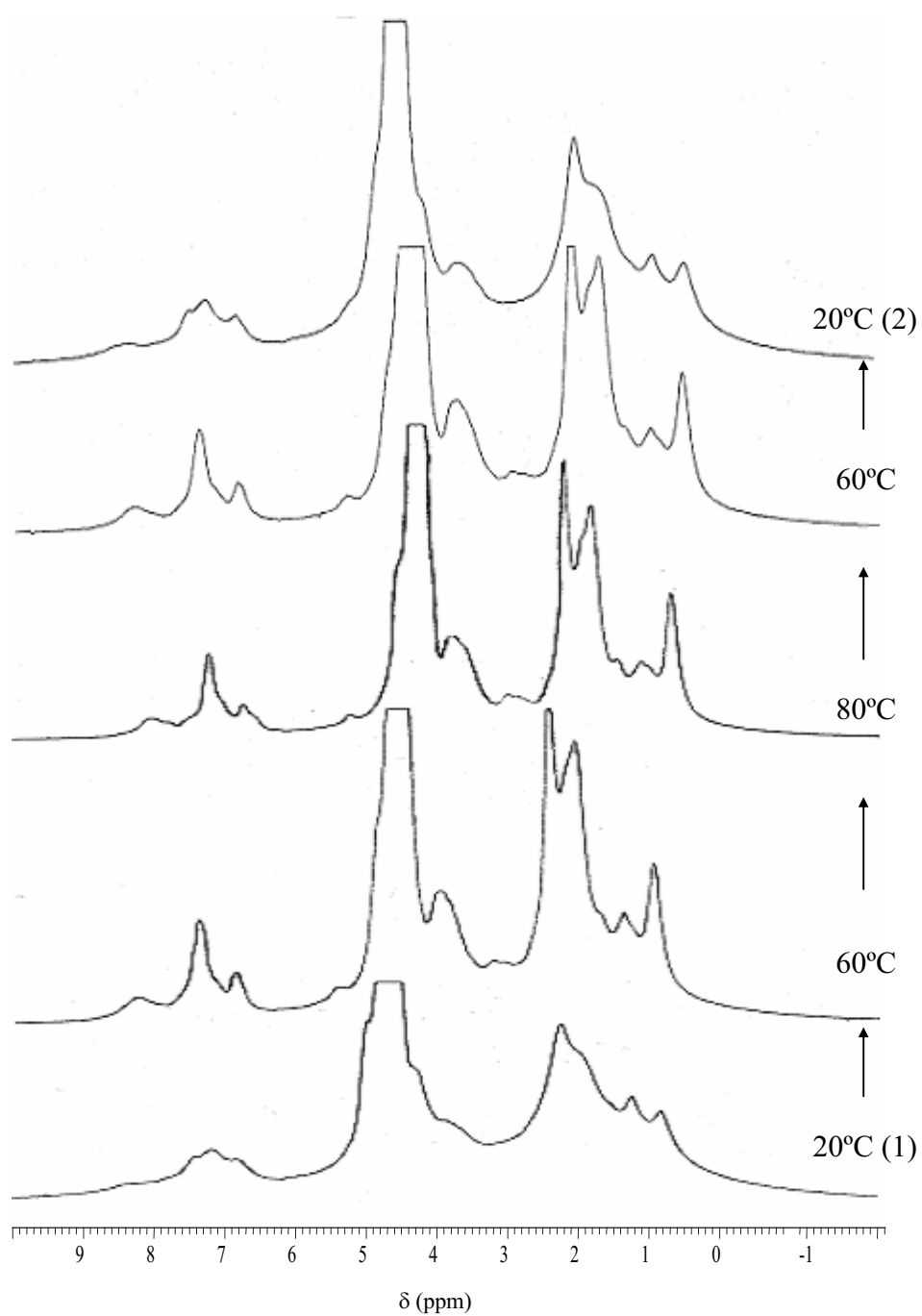


Figura 5.8- Comportamento do sistema glúten + 0,5% (m/m) de pentosanas hidrossolúveis ao longo do ciclo de aquecimento (20-80°C) e arrefecimento (80-20°C); todos os espectros adquiridos a 10 kHz, ns= 40.

Tabela 5.4 - Valores dos tempos de relaxação longitudinal – T_{1H} – para a amostra de glúten + 0,5% (m/m) de pentosanas hidrossolúveis da variedade Sorraia, hidratada a 50% D_2O (m/m), submetida a tratamento térmico 20-80-20°C

δ (ppm)	Atribuição		Temperaturas		
			T_{1H} (s) - 20°C antes tratamento térmico	T_{1H} (s) - 80°C	T_{1H} (s) - 20°C após tratamento térmico
1,2	CH_3-	Lípidos + Proteína	$0,494 \pm 0,005$	$0,750 \pm 0,014$	$0,849 \pm 0,010$
2,1	$-CH_2-$	Proteína	$0,543 \pm 0,008$	$0,689 \pm 0,014$	$0,830 \pm 0,005$
2,4	$-CH_2-$		$0,541 \pm 0,008$	$0,665 \pm 0,023$	$0,827 \pm 0,001$
4,1	$-CH$	Proteína + Amido + PHS	$0,552 \pm 0,007$	$0,750 \pm 0,019$	$0,865 \pm 0,010$
4,8	HOD	Água	$0,468 \pm 0,012$	$0,720 \pm 0,007$	$0,790 \pm 0,010$
5,1	$-CHO$	Amido + PHS	n.d.	$0,785 \pm 0,030$	$0,750 \pm 0,021$
6,9	$-NH_2$ aromáticos	Proteína	$0,537 \pm 0,009$	$1,05 \pm 0,11$	$0,834 \pm 0,015$
7,3	$-NH_2$ aromáticos		$0,545 \pm 0,016$	$0,904 \pm 0,076$	$0,825 \pm 0,023$
7,5	$-NH_2$		$0,551 \pm 0,010$	n.d.	$0,809 \pm 0,021$
8,3	$-NH$		$0,498 \pm 0,014$	$0,855 \pm 0,176$	$0,802 \pm 0,037$

n.d. – não detectável

Na presença de PHS, a 80°C, verifica-se ainda que os prótons $-NH$ apresentaram valores de T_{1H} próximos àqueles observados para os prótons $-NH_2$, contrariamente ao observado para o glúten sozinho onde os prótons $-NH$ se apresentaram mais afastados dos prótons $-NH_2$, indicando uma diminuição da mobilidade na amostra devido ao aquecimento.

A água (4,8 ppm) e os hidratos de carbono (4,1 ppm e 5,1 ppm) apresentaram valores de T_{1H} bastante semelhantes, na ordem dos 0,73-0,75 segundos, indicando uma maior

proximidade entre estes componentes. Na amostra de glúten isolado, a água (0,67 s) apresentou alguma separação relativamente ao amido (0,83 s). A adição de PHS parece assim ter contribuído para uma maior ligação entre a matriz de hidratos de carbono e a água, o que confirma o carácter hidrofílico manifestado pelas PHS.

Após o arrefecimento até 20°C e contrariamente ao observado para as amostras de glúten isolado, verifica-se que a amostra de glúten + 0,5% PHS mantém ainda uma grande mobilidade, tal como é deduzido pelos valores mais elevados de T_{1H} , e tal como será confirmado pela variação dos valores de T_{2H} . Após o tratamento térmico, observa-se uma maior proximidade entre todos os ambientes da proteína, incluindo os lípidos residuais. A água e os hidratos de carbono (5,1 ppm) continuam bastante próximos com valores de T_{1H} bastante semelhantes.

Relativamente aos valores de T_{2H} (Tabela 5.5) verifica-se que o aquecimento até 80°C promoveu a mobilização de todos os componentes, o que é mostrado pelo aumento dos valores de T_{2H} , um efeito igualmente observado no glúten SOR isolado. No entanto, contrariamente ao observado para esta última amostra, os componentes proteicos $-NH_2$ e $-NH$ (6,9-8,3 ppm) apresentam agora dois ambientes dinâmicos diferentes, apresentando dois valores de T_{2H} (T_{2A} e T_{2B}). Uma parte destes componentes (T_{2A}) mantém-se mais imobilizada (T_{2H} mais curtos) possivelmente devido à sua interacção em ligações intermoleculares (ligações de H e ligações hidrofóbicas) que sobrevivem à plasticização por efeito da hidratação e do aquecimento.

A 80°C, a presença de 0,5% de PHS parece não ter alterado a dinâmica da água ao nível do T_{2H} dado que os valores de T_{2H} apresentados pela água nas amostras de glúten + 0,5% PHS e glúten isolado foram semelhantes, indicando uma mobilidade de magnitude comparável.

Após o arrefecimento, a amostra de glúten + 0,5% PHS encontra-se, de um modo geral, mais mobilizada do que à temperatura ambiente inicial, apresentando valores de T_{2H} mais elevados. A maior mobilidade da amostra glúten + 0,5% PHS após o tratamento térmico foi igualmente verificada pelos tempos de relaxação T_{1H} . A água e os hidratos de carbono apresentam-se como os componentes mais móveis (% população $T_{2B} > 58\%$), o que é consistente com a maior proximidade da água com os hidratos de carbono

Tabela 5.5 - Valores dos tempos de relaxação transversal – T_{2H} – para a amostra de glúten + 0,5% (m/m) de pentosanas hidrossolúveis da variedade Sorraia, hidratado a 50% D₂O (m/m), submetida a tratamento térmico 20-80-20°C

δ (ppm)	Atribuição	20°C			80°C			20°C		
		antes do tratamento térmico						depois do tratamento térmico		
		T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% prótons móveis (T_{2B})	T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% prótons móveis (T_{2B})	T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% prótons móveis (T_{2B})
1,2	CH ₃ -	0,383 ± 0,015	-	-	0,565 ± 0,132	11,4 ± 0,7	67	0,423 ± 0,079	6,51 ± 1,22	40
2,1	-CH ₂ -	0,441 ± 0,023	-	-	5,46 ± 0,20	-	-	-	5,11 ± 0,13	-
2,4	-CH ₂ -	0,502 ± 0,035	-	-	9,56 ± 0,34	-	-	0,514 ± 0,082	3,33 ± 0,35	52
4,1	-CH	0,530 ± 0,045	-	-	0,072 ± 0,039	7,95 ± 0,34	78	0,069 ± 0,033	2,48 ± 0,36	58
4,8	HOD	1,55 ± 0,32	-	-	-	7,71 ± 0,11	-	1,12 ± 0,83	6,73 ± 0,21	96
5,1	-CHO	n.d.	-	-	1,03 ± 0,20	-	-	0,178 ± 0,079	3,71 ± 0,22	69
6,9	-NH ₂ aromáticos	0,448 ± 0,038	-	-	0,845 ± 0,105	6,54 ± 1,10	35	-	1,97 ± 0,41	-
7,3	-NH ₂ aromáticos	0,463 ± 0,053	-	-	0,620 ± 0,146	11,4 ± 0,9	65	-	1,83 ± 0,32	-
7,5	-NH ₂	0,491 ± 0,037	-	-	n.d.	n.d.	-	0,190 ± 0,032	3,45 ± 0,78	29
8,3	-NH	0,273 ± 0,023	-	-	0,185 ± 0,039	4,97 ± 0,31	66	0,560 ± 0,066	-	-

n.d. – não detectável

verificada pelos valores de T_{1H} . Os grupos proteicos mostram, na sua maioria, valores de T_{2H} mais baixos e uma menor percentagem de prótons móveis ($\%T_{2B}$). Na amostra de glúten isolado, após o arrefecimento, os componentes proteicos apresentaram uma maior percentagem de prótons móveis, e valores de T_{2H} mais elevados do que na amostra de glúten + 0,5% PHS. A diferença do comportamento observada para os componentes proteicos das duas amostras parece sugerir que a adição de 0,5% de PHS à amostra de glúten terá contribuído para o aumento da rigidez da proteína após o tratamento térmico, tendo a proteína formado, provavelmente, uma matriz separada da água e dos hidratos de carbono.

V. 3.3. Relação entre propriedades reológicas e propriedades espectroscópicas

Através dos estudos efectuados por reologia e por espectroscopia de RMN de sólidos foi possível verificar que as pentosanas hidrossolúveis extraídas das farinhas de trigo *Amazonas* e *Sorraia* afectaram as propriedades do glúten quer ao nível reológico quer ao nível da dinâmica molecular.

A adição de PHS às amostras de glúten conduziu à subida dos valores do módulo de conservação (G'), traduzindo um efeito estruturante de todo o sistema glúten+PHS. Ao nível do RMN de 1H , os tempos de relaxação de próton T_{1H} e T_{2H} revelaram uma diminuição da mobilidade de todos os componentes da amostra de glúten + 0,5% PHS relativamente à amostra de glúten isolado, o que parece estar de acordo com a subida dos valores de G' observados ao nível da reologia. Paralelamente à subida de G' , observou-se também a subida da componente viscosa, representada pelo módulo G'' . Este resultado não é de todo inesperado, uma vez que as PHS formam soluções bastante viscosas quando hidratadas. A formação de uma matriz viscosa no sistema deverá ter contribuído para o aumento de processos dissipativos de energia, o que se reflectiu no aumento de G'' .

O aumento do carácter elástico dos sistemas glúten + PHS deverá estar relacionado com a menor disponibilidade de água para plastificação da rede de glúten, bem como com o possível estabelecimento de interacções entre as PHS e a matriz proteica. Através dos tempos de relaxação de T_{2H} , foi possível verificar uma evidente diminuição da mobilidade da água, muito possivelmente devido à sua ligação com as PHS. Por outro lado, na amostra de glúten + 0,5% PHS, os valores de T_{1H} revelaram uma aproximação

entre a proteína e os hidratos de carbono, um comportamento não observado na amostra de glúten isolado. Este resultado parece sugerir que, de facto, as PHS deverão estabelecer alguma interacção com as proteínas do glúten, muito possivelmente através de ligações de hidrogénio com os grupos $-NH_2$ laterais das proteínas. Comparativamente à amostra de glúten isolado, estes grupos apresentaram uma grande diminuição de mobilidade, tal como evidenciado pela diminuição dos valores de T_{2H} , o que aponta para o envolvimento destes grupos na constituição de ligações de hidrogénio.

Um facto curioso a notar é que a introdução das PHS na amostra de glúten contribuiu para uma uniformização da mobilidade em todo o sistema, o que é evidenciado pelo comportamento monoexponencial do tempo T_{2H} de todos os componentes. A apresentação de uma distribuição homogénea de mobilidades, bem como a apresentação de uma magnitude de mobilidades comparável entre praticamente todos os componentes, poderá estar relacionada com o aumento do carácter viscoso da amostra devido às PHS, manifestado no aumento do valor de $\tan \delta$ (G''/G').

Durante o aquecimento das amostras de glúten+PHS verificou-se uma diminuição dos módulos viscoelásticos, o que deverá estar relacionado com a perda de estrutura do sistema devido ao enfraquecimento das ligações, por efeito do aquecimento. Os espectros de RMN de 1H -MAS mostram uma deslocação para mais baixo desvio químico do pico da água bem como dos grupos amídicos $-NH_2$ e $-NH$, o que revela o enfraquecimento das ligações de hidrogénio, estando assim coerente com o comportamento observado ao nível da reologia. A dinâmica de relaxação de próton mostra ainda um aumento de mobilidade das amostras de glúten isolado e de glúten + 0,5% PHS aquecidas até 80°C. O acréscimo de mobilidade foi no entanto mais evidente para a amostra de glúten com PHS, o que vai de encontro com a hipótese de que as PHS estabelecem interacções de natureza não-covalente (e.g. ligações de hidrogénio) com o glúten. Se por um lado, à temperatura ambiente, a adição de PHS contribuiu para a diminuição da mobilidade do sistema, supostamente devido ao maior número de ligações de hidrogénio, com o aquecimento, o enfraquecimento destas mesmas ligações terá produzido um efeito mais acentuado no comportamento das amostras.

Durante o aquecimento das amostras até 80°C, observou-se que quer as amostras de glúten quer as amostras de glúten + PHS apresentaram um valor mínimo de G' (G'_{min}) a uma temperatura ($T_{G'_{min}}$) cerca de 60°C, tendo o valor de G' , a partir deste ponto, voltado a subir ligeiramente até à temperatura máxima de aquecimento. O aumento de

G' entre a $T_{G'_{min}}$ e os 80°C parece indicar que houve um reforço da estrutura do sistema, possivelmente motivado pela reestruturação das ligações intermoleculares após desnaturação proteica. Esta reestruturação poderá ter contribuído para a formação de alguns agregados proteicos, tal como sugerido pela dinâmica do tempo de relaxação de T_{1H} .

Durante o arrefecimento das amostras glúten+PHS o comportamento do módulo G' não foi reversível, observando-se um desvio do comportamento inicial numa extensão dependente da percentagem das PHS.

Após o tratamento térmico, as amostras glúten+PHS manifestaram um comportamento qualitativamente semelhante à amostra de glúten isolado, apresentando valores do módulo G' ligeiramente superiores aos respectivos valores observados para o glúten. Para todas as amostras, os valores de G' foram ligeiramente superiores aos registados inicialmente antes do aquecimento, sugerindo um ligeiro fortalecimento da estrutura da amostra. O módulo G'' , porém, apresentou um comportamento reversível, recuperando os mesmos valores registados antes do tratamento térmico. Os valores de T_{1H} e T_{2H} registados após o tratamento térmico mostram que a amostra de glúten + 0,5% PHS conserva ainda uma elevada mobilidade, o que poderá estar relacionado com a persistência do carácter viscoso observado ao nível do comportamento reológico.

V. 4. Conclusões

Neste capítulo foi descrito o efeito da adição de pentosanas hidrossolúveis extraídas a partir das farinhas de trigo *Amazonas* e *Sorraia*, no comportamento reológico e espectroscópico do glúten, extraído igualmente a partir das mesmas variedades de farinhas. A combinação dos estudos de reologia fundamental com os estudos de espectroscopia de RMN de 1H permitiram obter e complementar a informação sobre comportamento ao nível macromolecular, bem como ao nível molecular.

A adição de PHS às amostras de glúten claramente exerceu uma alteração do comportamento do glúten não só ao nível reológico como ao nível espectroscópico.

Os estudos de reologia fundamental permitiram concluir que a adição de PHS às amostras de glúten contribuiu para a subida dos valores quer do módulo de conservação quer do módulo de perda, numa extensão dependente da percentagem bem como da

origem das PHS adicionadas. As PHS extraídas da variedades AMA exerceram um efeito mais pronunciado sobre as propriedades viscoelásticas do glúten, à temperatura ambiente, durante e após aquecimento. Este comportamento deverá estar relacionado com a maior razão arabinose/xilose, associada a uma massa molecular ligeiramente superior, verificada para as PHS da variedade AMA.

A subida do módulo de conservação devido à adição de PHS foi apoiada pela espectroscopia de ^1H . Através da dinâmica de relaxação do próton verificou-se que a adição de PHS conduziu a uma diminuição da mobilidade do sistema, tendo contribuído para uma maior homogeneidade da amostra.

A presença de PHS diminui as alterações irreversíveis que ocorrem no glúten durante aquecimento, acima de 60°C. A presença de PHS parece ter servido de protecção contra o efeito do aquecimento até 80°C, evitando ou diminuindo o processo de desnaturação caracterizado por uma maior imobilização das proteínas. Este efeito foi corroborado pela persistência da mobilidade verificada após o tratamento térmico pelo comportamento dos tempos de relaxação de $T_{1\text{H}}$ e $T_{2\text{H}}$, em que, contrariamente ao observado para o glúten, na amostra de glúten + 1%PHS, as proteínas mostraram ainda uma mobilidade evidente, de magnitude comparável à dos hidratos de carbono.

CAPÍTULO VI

**COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE GELIFICAÇÃO
DOS AMIDOS AMAZONAS E SORRAIA E INFLUÊNCIA DAS
PENTOSANAS HIDROSSOLÚVEIS NESSE PROCESSO**



VI. 1. Introdução

O amido é o principal constituinte das farinhas de trigo. No pão, bem como em muitos alimentos, o amido apresenta um papel bastante importante não só do ponto de vista nutricional, como também do ponto de vista funcional e tecnológico, apresentando-se como um importante componente estruturante (Biliaderis *et al.*, 1980; Okechukwu e Rao, 1997; Rolee e Le Meste, 1997, 1999). Em muitos procedimentos alimentares, o amido sofre processos hidrotérmicos, os quais envolvem a interação entre o amido e a água sob determinadas condições de temperatura. Estes processos envolvem os fenómenos de gelatinização e de retrogradação do amido. A gelatinização do amido é definida como “o colapso da ordem molecular no interior dos grânulos, juntamente com a alteração simultânea e irreversível de certas propriedades tais como o intumescimento dos grânulos, alteração do estado cristalino, perda da birrefringência, aumento da viscosidade e solubilização do amido” (Atwell *et al.*, 1988). A retrogradação do amido envolve a reorganização ao nível macromolecular dos géis de amido, a qual está relacionada essencialmente com a reassociação das cadeias de amilose. Para que o processo de gelatinização do amido ocorra, é importante que este absorva uma quantidade suficiente de água (Eliasson, 1980; Lund, 1988). A presença de outros componentes poderá afectar as propriedades de gelatinização do amido. Numa massa para panificação, por exemplo, o amido tem que competir com os outros constituintes da farinha para a disponibilidade da água (Eliasson, 1980), o que irá afectar não só as propriedades de gelatinização do amido como também as suas propriedades reológicas.

Como referido anteriormente, as pentosanas hidrossolúveis (PHS) constituem uma pequena fracção da composição total das farinhas de trigo, mas a sua presença influencia as propriedades físicas das massas de farinha, do glúten e do amido, afectando assim as propriedades de panificação das farinhas de trigo (Izydorczyk *et al.*, 1990, 1991; Michniewicz *et al.*, 1991, Faurot *et al.*, 1996; Gama *et al.*, 2000, Sasaki *et al.*, 2000). As PHS, sendo hidrocolóides, possuem uma elevada capacidade de absorção de água, formando soluções bastante viscosas. A presença de PHS nas farinhas de trigo surge como um elemento condicionador da distribuição da água entre os vários constituintes da farinha, esperando-se a competição entre as PHS e o amido na afinidade pela água.

O efeito de outros hidrocolóides (e.g. goma guar, goma de alfarroba, k-carrageninas, goma xantana, carboximetilcelulose) nas propriedades reológicas e de gelatinização e

retrogradação de pastas e géis de amido foi já descrito anteriormente por outros autores (Christianson *et al.*, 1981; Sajjan e Rao 1987; Alloncle *et al.*, 1989; Sudhakar *et al.*, 1996; Kim e Wang, 1999; Rojas *et al.*, 1999; Rosell *et al.*, 2001). Muitos dos efeitos observados são vantajosos para aplicações alimentares, incluindo a melhoria da capacidade de retenção de humidade, melhoria das propriedades viscoelásticas e de textura, bem como da qualidade do produto final e maior tempo de prateleira.

O efeito das pentosanas hidrossolúveis nas propriedades do amido ainda não é completamente conhecido e alguns resultados contraditórios têm sido reportados. Kim e D'Appolonia (1977a) mostraram que a adição de pentosanas diminui a quantidade de componentes do amido disponíveis para a cristalização, diminuindo assim a taxa de envelhecimento do pão. Longton e LeGrys (1981) referiram que a adição de pentosanas não afecta a retrogradação do amido. Em contrapartida, Janckiewicz e Michniewicz (1987) assumiram que o processo de retrogradação do amido estaria restringido pela formação de complexos de amido-pentosanas. Gudmundsson *et al.* (1991), trabalhando com arabinoxilanas purificadas, sugeriram que o efeito das pentosanas está relacionado com a disponibilidade da água para a gelatinização e retrogradação do amido, pelo que a adição de pentosanas poderia ter diferentes efeitos na recristalização do amido, dependendo da quantidade de água inicial. Yin e Walker (1992) mostraram que as pentosanas exercem um efeito significativo na diminuição da firmeza do pão. Sasaki *et al.* (2000) propuseram que o efeito das pentosanas na gelatinização do amido estaria dependente da amostra de amido, nomeadamente do conteúdo de amilose, e estaria relacionada com a razão das fracções de pentosanas não hidrossolúveis/pentosanas hidrossolúveis.

Vários métodos têm sido usados na monitorização das alterações que ocorrem durante a gelatinização e retrogradação do amido, e uma vasta gama de publicações pode ser encontrada sobre este tema. As propriedades de gelatinização e de retrogradação do amido têm sido estudadas através de métodos microscópicos (Hoseney *et al.*, 1971; Eliasson, 1986; Autio, 1990; Svegmarmark *et al.*, 1993; Lii *et al.*, 1995; Jacobson *et al.*, 1997) baseados na observação das alterações que ocorrem ao nível dos grânulos de amido, bem como através de métodos que avaliam a alteração das propriedades físico-químicas do amido durante a sua gelatinização. Estes métodos incluem a avaliação dos padrões de difracção de raios-X (Ghiasi *et al.*, 1982; Roulet *et al.*, 1988; Lii *et al.*, 1995), avaliação das

propriedades térmicas do amido através da calorimetria de varrimento diferencial (Biliaderis *et al.*, 1980; Eliasson, 1980; Kugimiya e Donovan, 1981; Evans, 1986; Roulet *et al.*, 1988; Biliaderis e Tonogai, 1991; Morrison *et al.*, 1993a); Conde-Petit e Escher, 1994; Hayakawa *et al.*, 1997; Lopes da Silva e Beirão da Costa, 1997; Rojas *et al.*, 1999; Turhan e Gunasekaran, 2002) e análise mecânica dinâmica (Roulet *et al.*, 1988; Rolee e LeMeste, 1999), e avaliação das propriedades viscoelásticas do amido (Eliasson, 1985, 1986; Evans, 1986; Clark *et al.*, 1989; Doublier e Choplin, 1989; Hansen *et al.*, 1991; Biliaderis e Tonogai, 1991, Svegmarmark *et al.*, 1993; Conde-Petit e Escher, 1994; Lii *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 1997; Hayakawa *et al.*, 1997; Rojas *et al.*, 1999; Rossel *et al.*, 2001; Lagarrigue e Alvarez, 2001).

Muitos dos estudos reológicos têm sido realizados através de métodos viscosimétricos, recorrendo ao uso de amilógrafos e viscosímetros, sujeitando as amostras a tensões e deformações bastante elevadas. Contrariamente a estes métodos, os ensaios de oscilação de baixa amplitude de deformação conduzidos na zona viscoelástica linear não perturbam a estrutura da amostra em estudo. Devido à sua natureza não destrutiva, esta abordagem tem sido usada com sucesso no estudo dos processos de gelificação de vários sistemas de polímeros (Ross-Murphy, 1995; Lopes da Silva *et al.*, 1998).

A caracterização de sistemas de amido ao nível molecular tem sido efectuada através de técnicas de espectroscopia de RMN, sobretudo através da espectroscopia de RMN de ^{13}C (Callaghan *et al.*, 1983; Gidley e Bociek, 1985, 1988; Jane e Robyt, 1985; Horri *et al.*, 1987; Morrison *et al.*, 1993a,b; Morgan *et al.*, 1995) e de ^1H (Jaska, 1971; McIntyre *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1992). O comportamento da água e do amido ao longo do processo de gelatinização tem também sido acompanhado através de estudos de RMN (Jaska, 1971; Lechert *et al.*, 1988; Thebaudin *et al.*, 1998). A espectroscopia de RMN tem-se revelado também bastante útil na caracterização de outros polissacarídeos, tais como arabinoxilanas (Kovac *et al.*, 1980, Annison *et al.*, 1992; Hoffman *et al.*, 1992; Vinkx *et al.*, 1995; Roels *et al.*, 1999; Delcour *et al.*, 1999b; Roubroeks *et al.*, 2000), glucanas (Tanner *et al.*, 1987; Roubroeks *et al.*, 2000, Lazaridou *et al.*, 2003), e carrageninas (van de Velde *et al.*, 2002; Tojo e Prado, 2003). Embora a caracterização do amido e das pentosanas por espectroscopia de RMN tenha já sido reportada, a caracterização de sistemas mistos constituídos por amido e pentosanas não foi ainda efectuada.

Dada a importância que as pentosanas exercem no comportamento do amido e, por conseguinte, no comportamento das farinhas de trigo durante o processo de panificação, neste capítulo comparam-se as propriedades de gelificação dos amidos obtidos a partir das variedades de trigo Amazonas e Sorraia, utilizando técnicas reológicas e espectroscópicas, e descreve-se o efeito das pentosanas hidrossolúveis nessas propriedades, procurando-se estabelecer uma relação entre as propriedades reológicas fundamentais e o comportamento ao nível da dinâmica molecular. As propriedades reológicas dos sistemas aquosos de amido e amido com pentosanas foram estudadas através de ensaios de oscilação a baixa amplitude de deformação, tendo-se acompanhado os processos de gelatinização e evolução de estrutura ao longo de um processo de aquecimento/arrefecimento. Ao nível molecular, estes sistemas foram caracterizados através de ensaios de espectroscopia de RMN de ^{13}C e de ^1H . O comportamento do amido, bem como o efeito da presença de pentosanas, foi estudado através de ensaios de RMN de ^1H , registando-se espectros a várias temperaturas durante um ciclo de aquecimento/arrefecimento. O comportamento dos sistemas ao longo do tratamento térmico foi seguido através da dinâmica de relaxação, a qual permitiu seguir a mobilidade molecular quer do amido, quer da água, ao longo da gama de temperaturas analisada. Resultados complementares acerca das transições de fase do amido e amido+PHS foram obtidos por calorimetria de varrimento diferencial.

VI. 2. Materiais e Métodos

VI. 2.1. Amostras de amido e de pentosanas hidrossolúveis

As amostras de amido e de pentosanas hidrossolúveis (PHS) de cada uma das variedades Amazonas (AMA) e Sorraia (SOR) foram obtidas a partir do fraccionamento das respectivas farinhas, tal como descrito em § II.2.1.

VI. 2.2. Preparação das amostras

Para o estudo do efeito das PHS nas propriedades do amido foram preparados sistemas de amido e sistemas de amido com PHS com diferentes concentrações de PHS, na gama de 0,5% (m/m) a 2% (m/m), com base no massa seca do amido. Para os mesmos sistemas, foram também preparadas amostras com duas condições de hidratação diferentes: a 50%

(m/m), procurando representar as condições características de hidratação do amido numa massa de panificação, e a 80% (m/m), procurando constituir amostras em condições de hidratação por excesso. As amostras de amido e amido com PHS foram hidratadas por adição de água destilada em quantidades apropriadas, tendo em conta o teor de humidade das amostras sólidas.

No caso das amostras preparadas para os ensaios de RMN, a água destilada foi substituída por água deuterada.

Por conveniência, prepararam-se amostras com um total de 4 g. As amostras hidratadas, agora em forma de dispersão, foram deixadas sob agitação magnética moderada durante 2h, permitindo uma hidratação mais homogênea, evitando a sedimentação de grânulos de amido hidratados e intumescidos.

VI. 2.3. Caracterização reológica dos sistemas de amido e amido com pentosanas hidrossolúveis

O estudo do comportamento reológico dos sistemas de amido e amido com PHS foi realizado num reómetro de tensão controlada (AR-1000, TA Instruments, New Castle, DE) equipado com uma geometria placa-cone (cone em aço inox, 4 cm diâmetro, 2° de ângulo). Foi também utilizada uma geometria de placa-placa (placa acrílica rugosa, 4 cm diâmetro, 500 µm gap), de modo a prevenir o deslizamento da amostra susceptível de acontecer nos ensaios de tratamento térmico (20-80-20°C). Todos os ensaios foram conduzidos na zona viscoelástica linear, a uma baixa amplitude de deformação (0,5 % γ).

Após as 2h de hidratação sob agitação moderada contínua, as amostras foram cuidadosamente transferidas para o prato do reómetro. Tal como anteriormente referido para as amostras de farinha, as perdas de água por evaporação foram minimizadas protegendo as margens de amostra mais expostas com um óleo mineral de baixa viscosidade ($d=0.84$ g/mL, Sigma-Aldrich Química SA, Sintra, Portugal).

Depois de colocada no reómetro, a amostra ficou em repouso durante 1 min antes de se iniciar qualquer tipo de teste, permitindo, assim, uma uniformização das condições para todas as amostras. No estudo de dispersões de amido, um dos principais problemas ao nível experimental é a ocorrência da sedimentação de partículas (Frith e Lips, 1995). A taxa de

sedimentação está dependente da concentração das partículas, diminuindo rapidamente com o aumento da concentração (Evans e Haisman 1979). No estudo efectuado, a ocorrência da sedimentação de grãos de amido antes da gelatinização não influenciou os resultados, tal como concluído a partir dos vários ensaios efectuados previamente em amostras de amido que ficaram em repouso, na placa do reómetro, durante intervalos de tempo diferentes. Assim, pode-se assumir que, mesmo para as amostras mais diluídas, a sedimentação pode ser desprezada.

A gelatinização dos sistemas de amido e amido com pentosanas foi estudada directamente no reómetro, através de ensaios de varrimento de temperatura, onde as amostras foram aquecidas de 20°C a 80°C, a uma taxa de 2°C/min e a uma frequência constante de 0,5 Hz. No sentido de estudar a extensão do efeito do tratamento térmico nas amostras, em alguns ensaios os sistemas foram aquecidos de 20°C a 95°C. Depois de alcançar os 80°C / 95°C, as amostras foram mantidas a esta temperatura durante 10 min, tendo-se registado a evolução do sistema através de ensaios de varrimento no tempo, a uma frequência constante (0,5 Hz). Após os 10 min a 80°C / 95°C, as amostras foram arrefecidas até 20°C tendo-se acompanhado o comportamento do sistema novamente através de ensaios de varrimento de temperatura (2°C/min, 0,5 Hz). A temperatura foi controlada com uma precisão de $\pm 0,1$ °C através do sistema Peltier localizado no prato inferior do sistema de medida do reómetro. Após o arrefecimento até 20°C, o comportamento viscoelástico dos sistemas foi analisado através de ensaios de varrimento de frequência realizados numa gama de frequências de 0,05-5 Hz, a uma temperatura constante de 20°C e 0,5% de deformação. Após o ensaio de varrimento de frequência, realizou-se um ensaio de varrimento no tempo, podendo-se, deste modo, acompanhar o processo de envelhecimento dos sistemas.

VI. 2.4. Caracterização dos sistemas por calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

O estudo do efeito das PHS nas propriedades térmicas do amido foi efectuado por ensaios de calorimetria diferencial de varrimento (DSC), realizados num calorímetro DSC-50 (Shimadzu, Japan). Uma alíquota (10 ± 2 mg) das dispersões de amido e de amido+PHS

preparadas tal como explicado em § VI.2.1 foram transferidas para cadinhos de alumínio de alta pressão que foram hermeticamente selados. Um cadinho vazio também hermeticamente fechado foi utilizado como referência. Os cadinhos foram aquecidos de 25°C a 140°C, a uma taxa de aquecimento de 2°C/min, sob uma atmosfera de azoto. As amostras foram depois arrefecidas lentamente à temperatura ambiente, e foram armazenadas a 4°C durante 7 dias. Após este tempo, as amostras foram novamente analisadas no calorímetro, sendo aquecidas nas mesmas condições indicadas anteriormente. Todos os testes foram efectuados pelo menos em triplicado. Para cada endotérmica, as temperaturas e as entalpias de transição foram avaliadas utilizando o software TA Work Station (Versão 1.01, Shimadzu, Japão).

VI. 2.5. Caracterização dos sistemas de amido e amido com pentosanas hidrossolúveis por RMN de estado sólido

As amostras de amido isolado e amido com PHS foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, tendo-se registados espectros de carbono (^{13}C -CP/MAS) e de protão (^1H -MAS).

Os espectros de ^{13}C -CP/MAS e de ^1H -MAS foram obtidos num espectrómetro Bruker DRX 4000, operando a uma frequência de campo B_0 de 100.6 MHz para o carbono e 400 MHz para o protão, utilizando uma sonda Bruker de polarização cruzada e com rotação segundo o ângulo mágico (CPMAS) de 4mm. As amostras foram colocadas num rotor de 4mm tapado com uma tampa de cerâmica, possibilitando assim a realização de ensaios a temperaturas até 80°C. O rotor foi pesado antes e depois da aquisição por RMN para verificar a possibilidade de perdas de água por evaporação. A variação do peso foi nula ou praticamente desprezável ($\pm 0,001\text{g}$).

Os espectros de ^{13}C - CP/MAS foram registados utilizando impulsos de 90° de 4-5 μs e com um tempo de intervalo entre scans de 4 s, a uma velocidade de rotação de 6 kHz. Os espectros de ^1H foram registados utilizando impulsos de 90° durante um tempo de contacto de 3-5 μs e um tempo de intervalo entre ciclos de 4-5s a velocidades de rotação entre 0-32 kHz.

Os tempos de relaxação T_{1H} foram obtidos usando a sequência “inversão-recuperação” ($180^\circ_x - \tau - 90^\circ_x$). Utilizaram-se 12 a 14 valores de tempos de intervalo entre pulsos, numa gama de 0,05-15s, e a uma velocidade de rotação de 10 kHz. Os valores de T_{1H} foram calculados por ajuste exponencial das intensidades $I(\tau)$ dos picos do espectro registadas, versus o tempo de intervalo entre pulsos (τ), de acordo com a equação 1.34 (ver § I.2.2.3.2).

Os tempos de relaxação T_{2H} foram obtidos usando a sequência de pulsos Carr-Purcell-Meiboom-Gill ($90^\circ_x - \tau - 180^\circ_y$). Utilizaram-se 12 a 14 valores de tempos de intervalo entre pulsos, numa gama de 0,05-20 ms, e a uma velocidade de rotação de 10 kHz. Os valores de intensidade (A) de cada pico foram representados graficamente em função do tempo de intervalo entre pulsos (τ). O comportamento de relaxação foi descrito por uma das exponenciais representadas pelas equações 3.1 e 3.2 (ver secção III.2.4)

Os ensaios de temperatura foram realizados para temperaturas na gama 20-80°C, e velocidades de rotação de 10 kHz. A temperatura foi controlada utilizando uma unidade de aquecimento VT (B-VT Bruker 2000), com uma variação de $\pm 0.2^\circ\text{C}$. As amostras foram aquecidas directamente dentro da sonda e permaneceram no mínimo 15 min a cada temperatura, antes da aquisição, para atingir o equilíbrio.

VI. 3. Resultados e Discussão

VI. 3.1. Caracterização reológica das amostras de amido e amido com pentosanas hidrossolúveis

VI. 3.1.1. Identificação da zona de comportamento viscoelástico linear

Na caracterização reológica de amostras de amido e amido com PHS foram realizados ensaios de oscilação a baixa amplitude de deformação, os quais foram conduzidos na zona de comportamento viscoelástico linear.

A zona de comportamento viscoelástico linear foi definida para géis de amido com dois níveis de hidratação (50% e 80% água (m/m)), após um ciclo de aquecimento/arrefecimento (20-80-20 °C). Para tal foram efectuados ensaios de varrimento de tensão sinusoidal aplicada, avaliando-se a sensibilidade da amostra à deformação imposta. O valor de amplitude de deformação limite, até ao qual se considera a existência de comportamento viscoelástico linear, e definido aqui como o valor correspondente a 95% do valor inicial do módulo, foi inferior para as amostras de amido hidratadas a 80% (m/m), com um valor limite de 0.61%, comparativamente às amostras de amido hidratadas a 50% (m/m) que apresentaram um valor de deformação limite de 1.4%. A Figura 6.1 apresenta exemplos deste comportamento, para amostras de amido da variedade SOR.

Dados estes resultados, optou-se por trabalhar a uma amplitude de deformação de 0.5%, de modo a satisfazer a condição de comportamento linear para as amostras de amido em ambas as condições de hidratação.

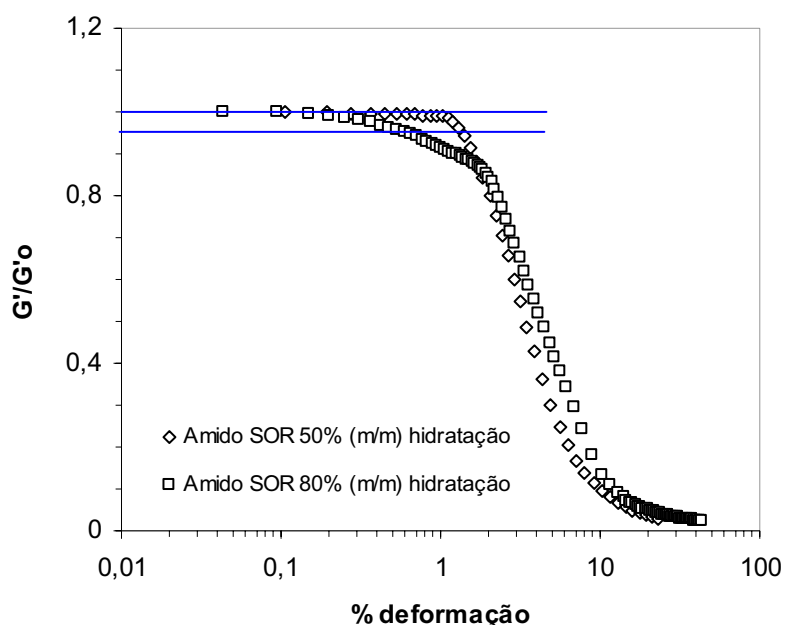


Figura 6.1 - Valores de módulo de conservação relativo (G'/G'_0) em função da amplitude de deformação imposta (γ , %), para amostras de amido da variedade Sorraia a 50% (m/m) e 80% (m/m) de hidratação, ensaiadas após aquecimento/arrefecimento no reómetro (20-80-20°C). G'_0 corresponde ao valor do módulo inicial, para os mais baixos valores de deformação ensaiados.

VI. 3.1.2. Comparação das propriedades reológicas dos amidos das variedades Amazonas e Sorraia

A comparação das propriedades de gelificação dos amidos das variedades AMA e SOR efectuou-se recorrendo-se a ensaios dinâmicos a baixa amplitude de deformação, realizados durante o aquecimento da dispersão de amido, “in situ”, no reómetro, permitindo avaliar a evolução dos módulos viscoelásticos durante o processo de gelatinização e formação do gel.

As amostras de amido foram preparadas com dois graus diferentes de hidratação, 50% (m/m) e 80% (m/m), e foram sujeitas a dois tratamentos térmicos diferentes, 20-80-20°C e 20-95-20°C. As amostras foram aquecidas de 20°C até 80°C (ou 95°C), onde permaneceram 10 min à temperatura máxima. Após este tempo, as amostras foram arrefecidas novamente até 20°C. A Figura 6.2 apresenta a evolução do módulo de conservação (G') em função da temperatura, para amostras de amido das variedades AMA e SOR, preparadas a 50% (m/m) e 80% (m/m). As curvas obtidas evidenciam perfis característicos de sistemas de amido durante a gelatinização (Eliasson e Bohlin, 1992; Lii *et al.*, 1995), observando-se uma reprodutibilidade dos resultados para cada grupo de amostras preparadas com o mesmo grau de hidratação.

Por observação da Figura 6.2, verifica-se que a quantidade de solvente utilizado para a hidratação das amostras exerce uma grande influência no comportamento reológico dos sistemas. As amostras preparadas com diferentes graus de hidratação apresentaram curvas qualitativa e quantitativamente diferentes: as amostras hidratadas a 80% (m/m) apresentaram curvas com perfis diferentes quer durante o aquecimento, quer durante o arrefecimento, apresentando módulos viscoelásticos bastante mais baixos, o que revela uma mais fraca interacção entre os grânulos de amido, tal como será discutido nos parágrafos seguintes.

Para ambos os sistemas com diferente grau de hidratação, o processo de aquecimento apresentou três fases distintas. Durante a fase inicial do aquecimento não se observaram alterações significativas no comportamento reológico dos sistemas. Após esta fase e para temperaturas acima de um determinado valor crítico, verifica-se uma subida drástica dos valores dos módulos viscoelásticos, seguindo-se, por último, uma descida desses valores

numa extensão variável de acordo com a temperatura máxima a ser atingida e com o grau de hidratação do sistema.

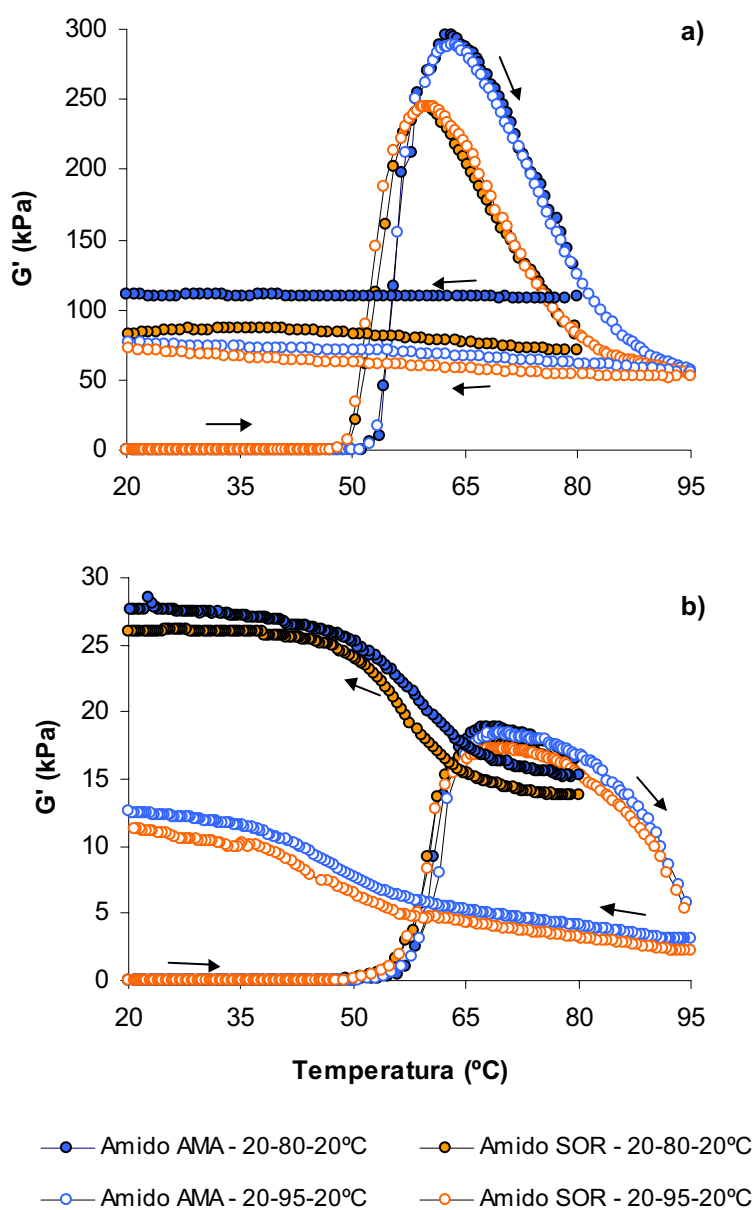


Figura 6.2 - Curvas de varrimento de temperatura ($\omega=0.5$ Hz, $\gamma=0.5$ %, 2 °C/min) para dispersões de amido das variedades Amazonas (AMA) e Sorraia (SOR); a) - 50% (m/m) de hidratação; b) - 80% de hidratação.

Alterações semelhantes das propriedades reológicas durante o aquecimento de sistemas de amido foram também observadas por outros autores (Eliasson, 1986; Tester e Morrison,

1990; Kokini *et al.*, 1992; Lii *et al.*, 1995, Yang e Rao, 1998; Jane *et al.*, 1999). As modificações observadas devido à elevação da temperatura resultam, no seu conjunto, das alterações estruturais que ocorrem nos grânulos de amido aquando da sua gelatinização. Os eventos responsáveis pelo processo gelatinização do amido bem como pelo comportamento reológico observado são a seguir explicados com mais detalhe.

Quando o amido é misturado com a água à temperatura ambiente, os grânulos de amido normais e não danificados apresentam-se insolúveis e apenas aumentam de volume por absorção de água, numa extensão muito pouco significativa (Caesar, 1950; Kokini *et al.*, 1992). Quando o sistema é sujeito a um aquecimento gradual, a partir de uma determinada temperatura característica, os grânulos de amido começam a aumentar ligeiramente de volume. Nesta fase, a variação do volume dos grânulos é reversível e as propriedades ópticas (i.e. birrefringência) dos grânulos são mantidas. Com a continuação do aquecimento do sistema, a hidratação dos grânulos aumenta e estes continuam a aumentar de volume. A integridade dos grânulos é mantida por uma rede formada pelas ligações de hidrogénio intermoleculares, e não se observam quaisquer alterações significativas nas propriedades reológicas (Biliaderis *et al.*, 1980; Lund, 1988; Lineback, 1986; Eliasson, 1986; Okechukwu e Rao, 1995). À medida que os sistemas são aquecidos e a temperatura aumenta, um ponto crítico é atingido a partir do qual os valores dos módulos viscoelásticos aumentam drasticamente. Esta temperatura corresponde ao aumento irreversível do volume dos grânulos e é comumente denominada por *temperatura de gelatinização*. A partir desta temperatura, a estrutura dos grânulos de amido é alterada significativamente e as suas propriedades de birrefringência são perdidas. As ligações de hidrogénio que mantinham a integridade estrutural dos grânulos são destruídas, as moléculas de água estabelecem ligações com os grupos hidroxilo das unidades de glucose das cadeias de amilose e amilopectina e os grânulos ficam completamente hidratados, aumentando cada vez mais de volume. Com o aumento de volume, a condição de empacotamento (i.e. o espaço entre os grânulos é mínimo) dos grânulos é atingida, as interações grânulo-grânulo são potenciadas e alguns componentes intragranulares começam a difundir-se para o meio aquoso, sobretudo amilose (Tester and Morrison, 1990; Lii *et al.*, 1995; Eliasson and Gudmundsson, 1996). Como resultado, os valores dos módulos viscoelásticos aumentam rapidamente até que um ponto máximo é atingido (G' máximo) correspondente ao início

da ruptura dos grânulos. A partir deste ponto os módulos viscoelásticos diminuem por efeito do enfraquecimento das interações entre os grânulos provocado pelo abrandamento (i.e. perda de resistência) e aumento da deformação destes, e consequente ruptura (Eliasson e Bohlin, 1982). Porém, quando o ponto máximo é atingido, nem todos os grânulos são destruídos, permanecendo na dispersão alguns grânulos ainda hidratados e material intragranular lixiviado para o meio aquoso. Com o aumento da temperatura, o grau de desintegração da estrutura dos grânulos é cada vez maior, pelo que os valores de G' continuam a decrescer. Pela observação das Figuras 6.2a e b, verifica-se que o aquecimento das amostras até 95 °C reflectiu-se na continuação da diminuição dos valores de G' , para valores cerca de um terço do valor de G' máximo, tendo este efeito sido mais pronunciado nas amostras com 80% (m/m) de hidratação. Uma análise mais cuidada das figuras mostra ainda que a 80°C os valores de G' entre as duas variedades de amido são diferentes, aproximando-se estes quando os sistemas foram aquecidos até 95°C. A esta temperatura, a desintegração dos grânulos terá já ocorrido numa maior extensão, pelo que os valores de G' tendem a atingir um patamar.

Tal como referido, o ponto máximo observado nas curvas de aquecimento, correspondente ao valor máximo do módulo de conservação ($G'_{\text{máx}}$), é atingido quando a capacidade máxima de intumescimento da maioria dos grânulos é alcançada, desencadeando-se o processo de dissolução dos mesmos. Comparando as variedades de amido, verificou-se que o amido AMA apresentou um valor mais elevado de $G'_{\text{máx}}$, para os dois níveis de hidratação estudados. Estudos reológicos realizados anteriormente por outros autores (Miller *et al.*, 1973; Moss e Miskelly, 1984; McCormick *et al.*, 1995, Regina *et al.*, 1996; Zeng *et al.* 1997) em dispersões de amido revelaram existir uma correlação entre o pico máximo dos módulos viscoelásticos e a razão entre os teores de amilose e amilopectina. Zeng *et al.* (1997) atribuíram os valores máximos dos picos observados, à maior capacidade de intumescimento dos grânulos de amido com maior quantidade de amilopectina enquanto que Miller *et al.* (1973) atribuíram este efeito à maior quantidade de amilose lixiviada para o exterior dos grânulos de amido com maior quantidade de amilopectina, contribuindo assim para um aumento da viscosidade da rede formada pelas cadeias de amilose. O facto do amido AMA apresentar valores mais elevados do pico máximo poderá estar relacionado com a maior capacidade de intumescimento dos grânulos

desta variedade, já que esta apresentou uma menor razão amilose/amilopectina ($24,3 \pm 3,1$) comparativamente com a variedade SOR ($27,0 \pm 2,3$). A maior população de grânulos do tipo B apresentada pelo amido AMA (§ II.2.2.3) poderá também ser uma explicação para o maior valor do G' máximo apresentado para esta variedade. Uma maior quantidade de grânulos mais pequenos e esféricos proporciona um melhor empacotamento da matriz formada pelos grânulos de maior tamanho e de forma lenticular (Eliasson e Karlsson, 1983; Eliasson e Bohlin, 1992). Neste sentido, a área de superfície de interações grânulo-grânulo é maior o que, consequentemente, se reflecte nos valores mais elevados de G' máximo.

Durante o arrefecimento (Figura 6.2), a evolução da estrutura dos sistemas foi semelhante entre ambas as variedades, observando-se apenas diferenças ao nível do grau de hidratação das amostras.

As amostras hidratadas a 50% (m/m) apresentaram apenas um ligeiro aumento dos módulos viscoelásticos ao longo de toda a gama de temperaturas, o que sugere que a este nível de hidratação a gelatinização do amido não ocorreu em toda a sua extensão. É sabido que em condições de menor disponibilidade de água, o efeito de plasticização da água é menor, pelo que ocorrerão menores perdas de cristalinidade durante o aquecimento e uma menor quantidade de amilose será lixiviada para o exterior dos grânulos (Donovan, 1979; Eliasson, 1980). Este efeito é traduzido por um menor grau de gelatinização e, consequentemente, por uma menor evolução da estrutura do sistema durante o arrefecimento.

As amostras hidratadas a 80% (m/m) apresentaram curvas características de um gel mais estruturado, observando-se essencialmente diferenças ao nível dos valores relativos para cada tipo de tratamento térmico. O arrefecimento destas amostras é marcado pela subida dos valores dos módulos viscoelásticos para valores cerca de duas vezes superiores aos valores registados inicialmente a 80°C e 95°C e, sobretudo, pelo facto de as principais alterações se registarem a temperaturas inferiores a 60°C. Neste ponto observa-se uma inflexão da curva de arrefecimento, observando-se uma subida bastante acentuada dos valores G' . Foi sugerido (Hansen *et al.*, 1991) que esta temperatura corresponde ao ponto em que se dá a transformação sol-gel, com o estabelecimento de um sistema mais estruturado, formado por uma rede de ligações entre as cadeias de amilose.

Comparativamente com os sistemas aquecidos até 80°C, os sistemas aquecidos até 95°C apresentaram módulos viscoelásticos mais baixos ao longo de todo o processo de arrefecimento. Este resultado era já esperado uma vez que, tal como já referido anteriormente, os últimos valores de G' registados durante o aquecimento foram bastante mais baixos para estas amostras, revelando uma maior fragilidade do sistema. Porém, seria talvez de esperar que durante o arrefecimento, estes valores superassem os valores obtidos para as amostras aquecidas até 80°C, tendo em conta que uma maior quantidade de amilose é lixiviada para o meio para temperaturas mais elevadas (Eliasson, 1986; Autio, 1990), o que poderia contribuir para o fortalecimento do sistema. Contudo, parece ser evidente que uma maior quantidade de amilose no meio aquoso não contribui significativamente para uma maior estruturação do sistema durante o arrefecimento até 20°C. A menor estruturação apresentada pelos sistemas aquecidos a 95°C poderá estar relacionada com a presença de uma maior quantidade de amilopectina. Foi sugerido (Ellis and Ring, 1985; Hansen *et al.*, 1991) que, com o aquecimento de dispersões de amido a temperaturas superiores a 90°C, uma maior quantidade de amilopectina é solubilizada para o meio, o que impede a agregação das cadeias de amilose, contribuindo para um maior enfraquecimento do gel formado e portanto menores valores dos módulos viscoelásticos.

O comportamento viscoelástico das amostras de amido durante o tratamento térmico pode ser igualmente acompanhado através da evolução da tangente ao ângulo de perda ($\tan \delta$), parâmetro este que estabelece a relação entre a energia dissipada e a energia armazenada durante cada ciclo de oscilação (Fitzgerald *et al.*, 1988). A Figura 6.3 apresenta, numa escala mais pormenorizada, as principais alterações reológicas ocorridas na vizinhança da temperatura de gelatinização (i.e. ponto a partir do qual se verifica o aumento brusco dos módulos viscoelásticos), durante o aquecimento dos sistemas. Para todas as amostras, verificou-se que o comportamento viscoelástico variou ao longo do aquecimento, sobretudo na proximidade do início do processo de gelatinização do amido.

Na fase inicial do aquecimento do sistema, verificou-se um aumento dos valores da $\tan \delta$, até uma temperatura na vizinhança da temperatura de gelatinização, a partir da qual os valores diminuíram, estabilizando posteriormente ao longo do restante processo de aquecimento. O aumento dos valores de $\tan \delta$ é o reflexo de um aumento mais pronunciado dos valores G'' em relação aos valores de G' , já que o valor de $\tan \delta$ é dado pela razão

entre G'' e G' . Os valores mais elevados de G'' sugerem uma maior dissipação de energia no sistema, o que poderá acontecer através de processos de relaxação localizados tais como a hidratação das regiões mais amorfas dos grânulos provocando o seu intumescimento e deformação.

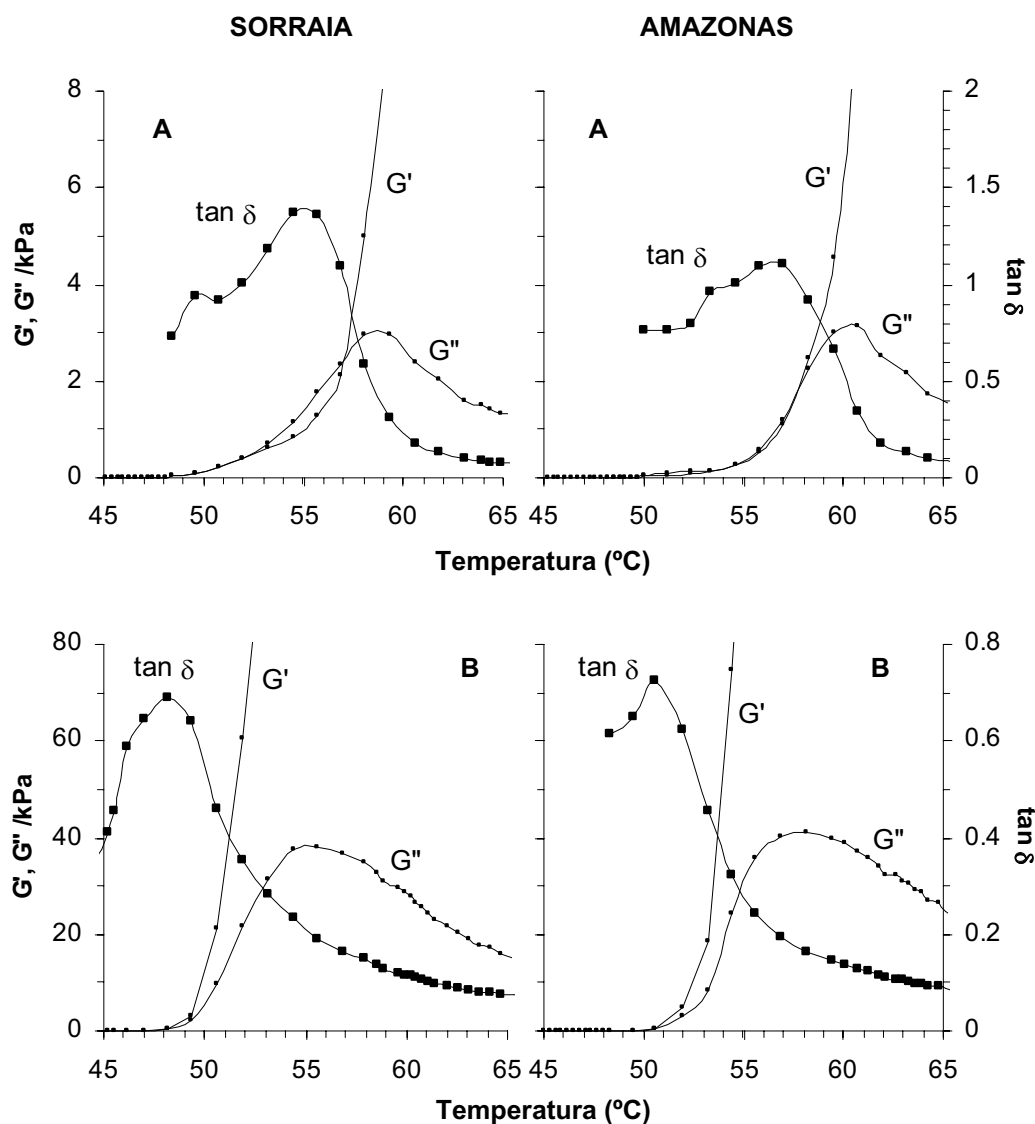


Figura 6.3 - Detalhe das principais alterações reológicas ocorridas na vizinhança da temperatura de gelatinização, durante o aquecimento das amostras de amido; resultados obtidos pelos ensaios de varrimento de temperatura ($\omega=0.5$ Hz, $\gamma=0.5$ %, $2^\circ\text{C}/\text{min}$) para dispersões de amido das variedades Amazonas e Sorraia a **(A)** 80% (m/m) e **(B)** 50% (m/m) de hidratação.

Para as amostras hidratadas a 50% (m/m) o pico da tangente de perda ocorreu a uma temperatura muito próxima mas anterior à temperatura de gelatinização. No caso das amostras hidratadas a 80% (m/m), o pico correspondente foi observado para uma temperatura também muito próxima, mas posterior à temperatura de gelatinização, o que sugere que o efeito de dissipação de energia foi maior nos sistemas com excesso de água, devido a um maior grau de hidratação.

Para temperaturas acima da temperatura de gelatinização, os valores de $\tan \delta$ diminuíram como consequência do aumento de G' em relação a G'' . Com a elevação da temperatura e o aumento do volume dos grânulos, as interações grânulo-grânulo são cada vez mais intensas e os movimentos dos componentes principais do amido tornam-se mais limitados. Como resultado, a elasticidade do sistema aumenta, sinónimo de um maior armazenamento de energia e, portanto, um aumento dos valores de G' e respectiva diminuição de $\tan \delta$.

Durante o arrefecimento, apesar dos diferentes perfis observados para os sistemas com diferente grau de hidratação, o comportamento viscoelástico registado foi bastante idêntico entre estes sistemas (resultados não apresentados). Durante toda a gama de temperaturas de arrefecimento, os valores de $\tan \delta$ mantiveram-se praticamente constantes, o que indica que os módulos G' e G'' apresentaram uma evolução relativamente paralela. Para os sistemas em estudo, registaram-se valores de $\tan \delta$ de 0.04-0.06 para as amostras hidratadas a 50% e 0.03 para as amostras hidratadas a 80%. Resultados semelhantes foram observados anteriormente por outros autores (Svegmark e Hermansson, 1991; Lii *et al.*, 1995; Rolee e Le Meste, 1997).

A temperatura de gelatinização das dispersões de amido variou entre as variedades de amido, tal como se pode verificar na Figura 6.3. As amostras de amido AMA apresentaram temperaturas de gelatinização mais elevadas do que as amostras de amido SOR e, por sua vez, um maior grau de hidratação conduziu a um ligeiro aumento das temperaturas de gelatinização. A 50% de hidratação, as temperaturas de gelatinização foram de 43,6°C ($\pm 0,2$) para a variedade SOR e 45,5°C ($\pm 0,2$) para a variedade AMA. Nas condições de maior percentagem de hidratação, as temperaturas de gelatinização foram de 44,5 °C ($\pm 0,2$) e 45,9 °C ($\pm 0,2$), respectivamente para as variedades SOR e AMA.

A maior temperatura de gelatinização manifestada pela variedade AMA poderá estar relacionada com a menor percentagem de amido danificado presente e com a distribuição

de tamanhos dos grânulos desta amostra. Em trabalhos anteriores (Zeng *et al.*, 1997; Tester 1997) foi já relatado o efeito da ruptura parcial dos grânulos de amido na temperatura de gelatinização, reportando-se existir uma relação inversa entre o teor de amido danificado e a temperatura de gelatinização. Outros autores (Eliasson e Bohlin, 1982; Rao *et al.*, 1997) estudaram a relação entre a distribuição do tamanho dos grânulos e a temperatura de gelatinização do amido, referindo que amidos com uma maior quantidade de grânulos tipo B iniciam o seu processo de gelatinização a temperaturas mais elevadas, por necessitarem de uma maior quantidade de energia térmica para o aumento de volume dos grânulos e alcance da condição de empacotamento. De facto, de acordo com os resultados atrás apresentados (§ II.2.2.3), o amido AMA apresentou uma menor percentagem de amido danificado e por sua vez, também um menor tamanho médio dos grânulos, o que contribuiu para que esta variedade apresente uma temperatura de gelatinização mais elevada do que a variedade SOR.

O efeito do tamanho dos grânulos de amido na temperatura de gelatinização foi igualmente estudado. Para tal, as amostras de amido foram divididas em fracções de diferentes tamanhos de grânulos, tal como referido em § II.2.1.3. Para este estudo, foram utilizadas as fracções com 30 e >30 minutos de sedimentação, correspondentes às fracções com tamanhos médios de grânulos de 16 e 7 μm , respectivamente. Depois de purificadas as amostras foram hidratadas a 50% (m/m) tal como indicado em § II.2.1.3 para as amostras de amido, e submetidas a ensaios de varrimento de temperatura conforme já referido. Tal como é claramente visível na Figura 6.4, a fracção com tamanhos de grânulos mais pequenos (>30 min) apresentou temperaturas de gelatinização mais elevadas do que a fracção de grânulos maiores, confirmando assim o facto de os grânulos de menor tamanho apresentarem temperaturas de gelatinização mais elevadas.

Tal como esperado, a temperatura de gelatinização é igualmente influenciada pela concentração de grânulos presentes na amostra (Figura 6.3). Tendo em conta o processo hidrotérmico da gelatinização, a condição de empacotamento dos grânulos é uma condição necessária para a subida drástica dos valores dos módulos viscoelásticos (Eliasson e Bohlin, 1982). Uma dispersão de amido mais diluída demorará mais tempo até que as interacções entre os grânulos sejam perceptíveis. Nas amostras preparadas a 80% (m/m) de

hidratação, a menor quantidade de grânulos de amido por unidade de volume faz com que seja necessário que estes sofram um maior aumento de volume para que o movimento e os choques entre si originem a subida evidente dos módulos viscoelásticos. Nas dispersões mais concentradas, i.e. 50% (m/m) de hidratação, a condição de empacotamento é alcançada mais rapidamente, pelo que a temperatura à qual se inicia a gelatinização é inferior à verificada para uma dispersão menos concentrada.

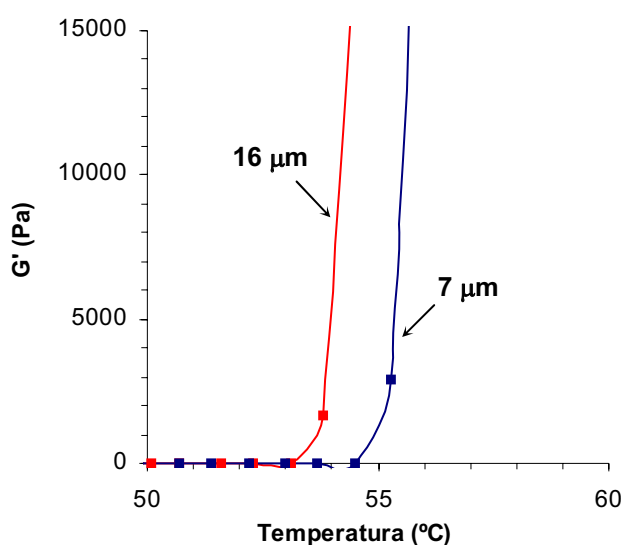


Figura 6.4 - Variação do módulo de conservação com a temperatura, para amostras de grânulos de amido da variedade Amazonas com tamanhos médios diferentes (16 µm e 7 µm), hidratadas a 50% (m/m); ensaio de varrimento de temperatura ($\omega=0.5$ Hz, $\gamma=0.5$ %, 2 °C/min)

Após o tratamento térmico, a amostra obtida é um gel constituído por uma rede formada por uma matriz de amilose na qual estão incorporados grânulos de amido hidratados e cadeias de amilopectina (Ring, 1985; Ring *et al.*, 1987; Eliasson, 1985; Tester e Morrison, 1990; Noel *et al.*, 1993; Lii *et al.*, 1995). Após o arrefecimento e o regresso da temperatura aos 20°C, os géis de amido foram submetidos a ensaios de varrimento em frequência, cujos espectros são apresentados nas Figuras 6.5 e 6.6, para as dispersões a 50% e 80% (m/m) de hidratação, respectivamente.

O comportamento do módulo de conservação (Figuras 6.5a e 6.6a) foi semelhante para as amostras de amido de ambas as variedades, independentemente do grau de hidratação e do

tipo de tratamento térmico. Para todos os sistemas verificou-se que o módulo G' apresentou um comportamento essencialmente independente da frequência, na gama de frequências analisada. Resultados semelhantes foram anteriormente reportados por outros autores, para dispersões de amido com diferentes concentrações (Muhrbeck e Eliasson, 1987; Svegmarm e Hermanson, 1990; Lii *et al*, 1995, Ahmad e Williams, 1998).

As amostras preparadas com excesso de água (Figura 6.6) apresentaram valores de G' mais baixos do que as amostras com menor grau de hidratação (Figura 6.5) revelando a maior fragilidade do gel formado a partir das amostras mais diluídas, tal como seria de esperar.

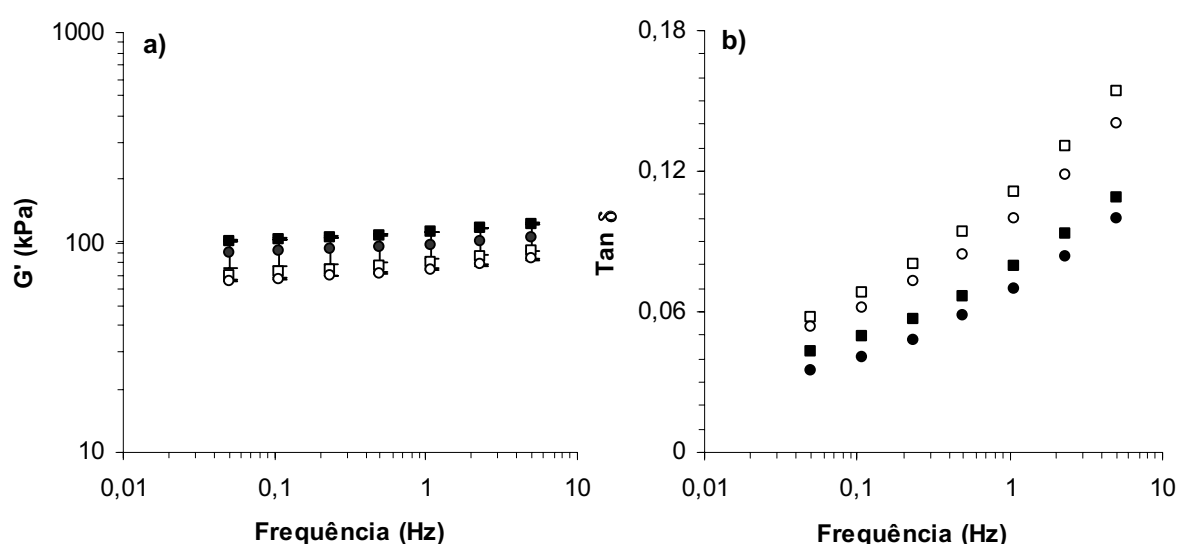


Figura 6.5 - Espectros mecânicos de dispersões de amido a 50% (m/m) de hidratação para as variedades Amazonas (■, □) e Sorraia (●, ○) adquiridos a 20°C, após tratamento térmico 20-80-20°C (símbolos a cheio) ou 20-95-20°C (símbolos abertos); a)-variação do módulo de armazenamento, e b) variação da tangente de perda com a frequência de oscilação

A temperatura final atingida durante o aquecimento, 80°C ou 95°C, influenciou o comportamento viscoelástico dos géis obtidos, influência esta dependente do grau de hidratação da amostra. No caso das amostras preparadas a 50% de hidratação, as amostras aquecidas até 95°C apresentaram valores de G' finais ligeiramente mais baixos do que as amostras aquecidas até 80°C. No caso das amostras preparadas a 80% de hidratação, a diferença entre os valores de G' foi maior, tendo as amostras aquecidas até 95°C

apresentado valores de G' bastante mais baixos do que as amostras aquecidas até 80°C. Estes resultados confirmam a menor estruturação verificada ao longo do arrefecimento, para os sistemas submetidos ao tratamento térmico 20-95-20°C, o qual deverá estar relacionado com a presença de uma maior quantidade de amilopectina no meio, impedindo a formação de uma rede densa de ligações entre as cadeias de amilose, contribuindo para a formação de um gel mais fraco.

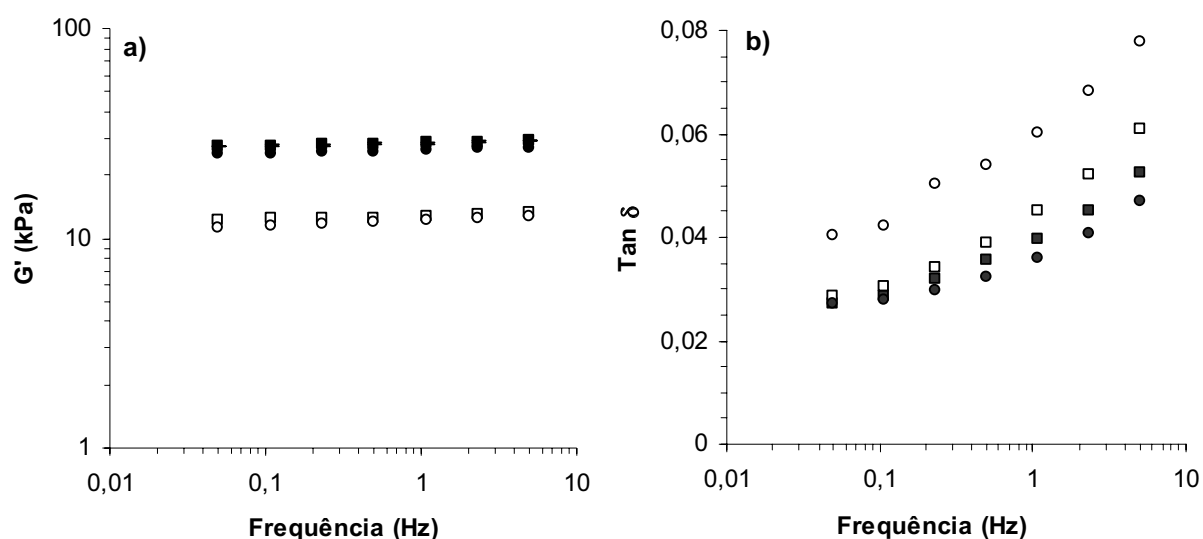


Figura 6.6 - Espectros mecânicos de dispersões de amido a 80% (m/m) de hidratação para as variedades Amazonas (,) e Sorraia (, ○) adquiridos a 20°C, após tratamento térmico 20-80-20°C (símbolos a cheio) ou 20-95-20°C (símbolos abertos); a)-variação do módulo de armazenamento, e b)- variação da tangente de perda, com a frequência de oscilação

À semelhança do observado por outros autores (Akuzawa *et al.*, 1995; Ahmad e Williams, 1998), a tangente de perda mostrou-se dependente da frequência, para todas as amostras, aumentando o seu valor para frequências mais elevadas. Porém, para todas as frequências testadas, os valores de $\tan \delta$ foram bastante inferiores à unidade, indicando que o módulo G' prevaleceu sempre sobre o módulo G'' exibindo, assim, uma característica típica de um gel com um comportamento sólido-elástico (Ross-Murphy, 1984; Biliaderis e Tonogai, 1991; Biliaderis e Juliano, 1993; Kokini, 1994) onde as deformações são essencialmente recuperáveis. As amostras hidratadas a 80% apresentaram valores de $\tan \delta$ mais baixos do

que as amostras hidratadas a 50%, indicando a prevalência do carácter elástico nos géis mais diluídos.

As amostras submetidas ao aquecimento até 95°C apresentaram valores de $\tan \delta$ mais elevados do que as amostras aquecidas até 80°C, o que resulta da diminuição dos valores de G' observada para aquelas amostras. No caso das amostras preparadas a 80% (Figura 6.6b), porém, a amostra de amido AMA aquecida a 95°C não apresentou uma variação significativa relativamente à respectiva amostra aquecida até 80°C, o que indica que para esta variedade, a componente viscosa foi igualmente afectada pelo aquecimento até 95°C, paralelamente à componente elástica.

É sabido que a estrutura de um gel de amido é determinada por vários factores, influenciados pelas condições de aquecimento, tais como a concentração do polissacarídeo, a estrutura dos grânulos de amido, a quantidade e o tipo de cadeias de amilose e amilopectina lixiviadas para o exterior dos grânulos e as interações amilose-amilopectina-grânulos. A amilose é a principal responsável pela formação de um gel com propriedades mais elásticas (Miles *et al.*, 1985; Eliasson, 1986; Clark *et al.*, 1989, Biliaderis e Tonogai, 1991, Hansen *et al.*, 1991, Biliaderis e Juliano, 1993; Jane *et al.*, 1999). Quanto maior a concentração de amilose, mais elástico é o gel formado, confirmando assim o facto das soluções mais diluídas apresentarem valores de G' mais baixos. O tamanho da cadeia da amilose parece também influenciar as propriedades de gelatinização do amido, tendo-se reportado a existência de uma relação inversamente proporcional entre a massa molecular da amilose e o valor de G' (Ellis e Ring, 1985; Clark *et al.*, 1989; Hansen *et al.*, 1991; Ahmad e Williams, 1998).

A quantidade de amilopectina lixiviada para o exterior dos grânulos tem um efeito prejudicial sobre as propriedades de agregação das cadeias de amilose. Para uma mesma concentração de amilose, os valores de G' diminuem à medida que a quantidade de amilopectina aumenta (Hansen *et al.*, 1991). Foi já atrás referido que uma maior quantidade de amilopectina é solubilizada para o meio para temperaturas superiores a 90°C (Ellis and Ring, 1985; Ring, 1985; Hansen *et al.*, 1991). Este dado parece mais uma vez justificar o facto de os géis formados pelas amostras aquecidas a 95°C terem apresentado valores dos módulos viscoelásticos mais baixos do que as amostras aquecidas a 80°C.

Os grânulos de amido que não foram destruídos durante o processo de gelatinização apresentam um papel particularmente importante no reforço da estrutura dos géis de amido (Eliasson e Karlsson, 1983; Eliasson, 1986; Brownsey *et al.*, 1987). Actuando como partículas de preenchimento da matriz de amilose, os grânulos de amido intumescidos contribuem para o fortalecimento do gel numa extensão dependente da sua deformabilidade e da fracção de volume por eles ocupada. Nas dispersões de amido hidratadas a 50%, nem todos os grânulos terão atingido a capacidade máxima de intumescimento, apresentando uma maior resistência à ruptura, permanecendo na dispersão e no gel, após arrefecimento, grânulos ainda inturgescidos. Nas dispersões hidratadas a 80%, os grânulos encontram-se bastante mais dispersos, a sua capacidade de intumescimento é bastante maior do que na dispersão mais concentrada, verificando-se uma mais extensa destruição dos grânulos com o aumento da temperatura. Assim, nos géis formados a partir da dispersão mais diluída, poucos ou nenhuns grânulos de amido terão permanecido intumescidos, não contribuindo para o reforço da estrutura do gel. Por sua vez, nos géis formados a partir da dispersão mais concentrada (50% m/m), os grânulos intumescidos não destruídos estabelecem interacções quer entre grânulos, quer entre grânulos e moléculas de amilose e amilopectina, actuando como um preenchimento da rede de gel formada, reforçando a estrutura do gel resultante, contribuindo assim para valores de G' mais elevados. A acção de partículas de preenchimento na modificação das propriedades de matrizes elastoméricas foi já descrita por outros autores (Lipatov, 1977).

O efeito do diferente tamanho médio de grânulos nas propriedades mecânicas dos géis de amido foi igualmente analisado (resultados não apresentados) em amostras de amido hidratadas a 50% (m/m), com um tamanho médio de grânulos de 7 e 16 μm , após o ciclo de aquecimento/arrefecimento 20-80-20°C. Para as amostras da variedade SOR, as fracções com menor tamanho médio de grânulos apresentaram valores de G' mais elevados do que as fracções com maior tamanho médio de grânulos. Para as amostras da variedade AMA, porém, não foram encontradas diferenças significativas entre as duas fracções com diferente tamanho médio de grânulos.

Um gel de amido não é um sistema em equilíbrio: ele altera-se com o tempo. Embora durante a gelatinização a estrutura cristalina do amido tenha sido destruída, durante o

arrefecimento e com o tempo ocorre a retrogradação e a cristalinidade do sistema é novamente restabelecida (Eliasson e Gudmundsson, 1996). O processo de retrogradação do amido é acompanhado por um enrijecimento do sistema cujo progresso é ditado pela concentração das cadeias de amilose e amilopectina, sendo ainda observada uma separação de fases entre os polímeros e o solvente, processo conhecido por sinérese (Biliaderis, 1992). Durante o armazenamento dos géis de amido, a amilose é responsável, essencialmente, pelas alterações a curto prazo, observando-se um aumento bastante rápido da rigidez nos géis de amilose. A amilopectina, por sua vez, é a principal responsável pelas alterações a longo prazo, observando-se uma maior sensibilidade dos géis de amilopectina à temperatura, sendo necessárias concentrações elevadas do polímero para que estas alterações possam ocorrer (Miles *et al.*, 1985; Ring *et al.*, 1987; Clark *et al.*, 1989; Biliaderis, 1992; Conde-Petit e Escher, 1994).

A evolução da estrutura dos géis de amido ao longo do tempo (i.e. envelhecimento) foi estudada após o ciclo de aquecimento/arrefecimento, à temperatura constante de 20°C. A Figura 6.7 apresenta a variação do módulo de conservação relativo (G'/G'_0) e da tangente ao ângulo de perda relativa ($\tan \delta / (\tan \delta)_0$) com o tempo, para as amostras com 80% (m/m) e 50% (m/m) de hidratação. Os valores G'_0 e $(\tan \delta)_0$ representam os valores dos parâmetros respectivos no início dos ensaios de varrimento no tempo.

Comparando as variedades, não foram observadas diferenças significativas entre as amostras de amido AMA e SOR. Ambas apresentaram os mesmos perfis de evolução durante o envelhecimento. A 80% de hidratação (Figura 6.7a) verificou-se que a tangente de perda diminuiu rapidamente nas primeiras duas horas de envelhecimento, diminuindo muito mais lentamente ao longo do restante período. Durante as mesmas duas horas, verificou-se também uma subida mais acentuada dos valores de G' , seguindo-se um pseudoplateau durante o qual se observou uma subida quase imperceptível dos valores de G' .

A marcada descida dos valores da $\tan \delta$ e a correspondente subida dos valores de G' durante o intervalo das duas primeiras horas sugere a ocorrência de alterações estruturais de curto prazo. Tal como já atrás referido, a 80% de hidratação, uma maior quantidade de amilose é lixiviada para o exterior dos grânulos, pelo que as alterações de curto prazo observadas deverão ser atribuídas ao rápido estabelecimento de estrutura tridimensional formada pela agregação das cadeias helicoidais de amilose (Clark *et al.*, 1989). Após o

período inicial, a lenta evolução dos sistemas parece revelar a ocorrência de processos de cristalização menos extensos, envolvendo neste caso cadeias de amilose e de amilopectina. Porém, estes processos parecem não alterar muito as propriedades viscoelásticas dos géis dada a quase insignificante variação do parâmetro $\tan \delta$.

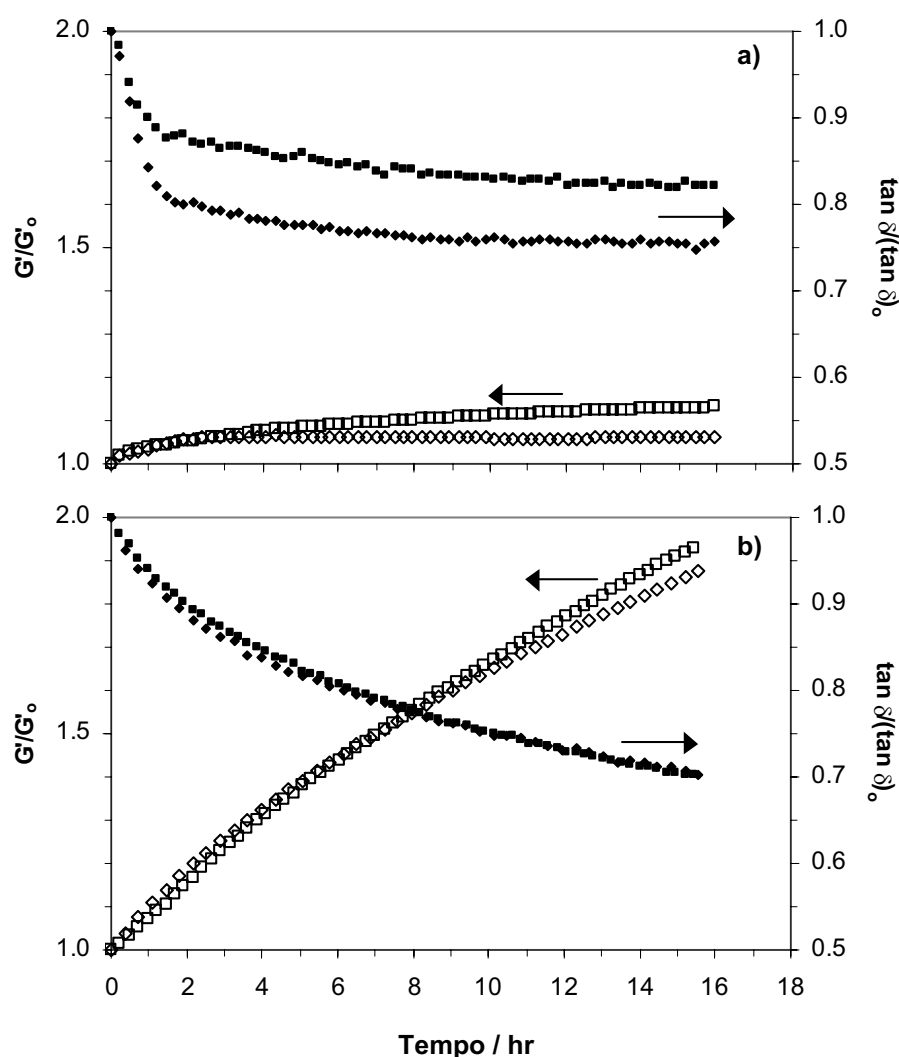


Figura 6.7 - Variação do módulo de conservação relativo (G'/G'_0 - símbolos vazios) e da tangente ao ângulo de perda relativa ($\tan \delta / (\tan \delta)_0$ - símbolos cheios) em função do tempo (20 °C, $\omega=0.5$ Hz, $\gamma=0.5$ %) de envelhecimento para géis de amido **(A)** 80% (m/m) e **(B)** 50% (m/m) de hidratação; G'_0 e $(\tan \delta)_0$ representam os valores de G' e $\tan \delta$ registados no início ($t=0$) do ensaio de varrimento no tempo. (,) amido Sorraia, e Sorraia (, \diamond) amido Amazonas.

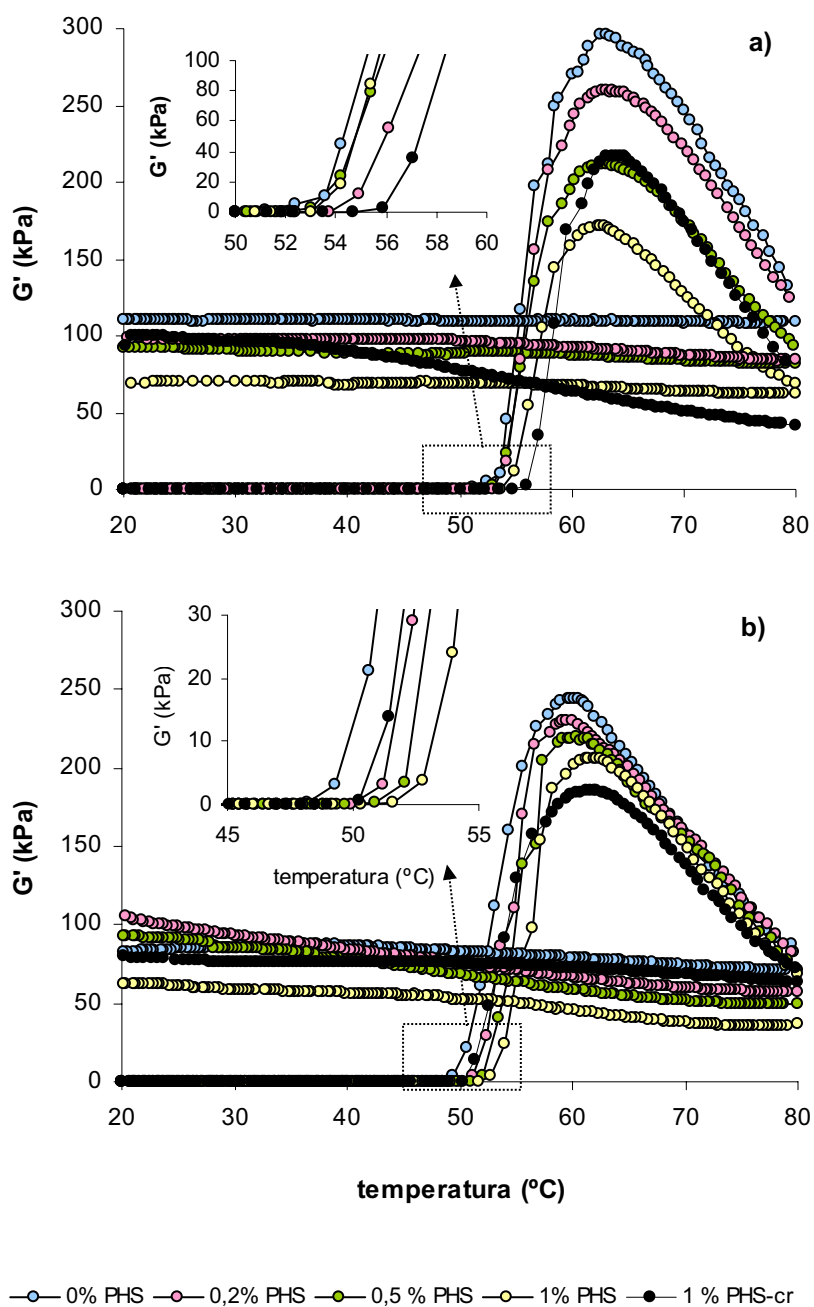
A 50% de hidratação, ambos os valores da tangente de perda e do módulo de conservação evoluem de um modo gradual e de forma mais acentuada, não se observando uma variação predominante no período inicial do envelhecimento. Os valores da tangente de perda diminuem de um modo contínuo como reflexo do aumento também contínuo do módulo G' , em detrimento do módulo G'' . A evolução observada para estes sistemas sugere que um pseudo-equilíbrio será atingido apenas após um longo período. As alterações reológicas ao longo do envelhecimento foram mais acentuadas para esta concentração, o que está de acordo com resultados anteriormente obtidos, indicando que a retrogradação é altamente dependente do nível de hidratação, sendo mais pronunciada para níveis à volta de 50% de hidratação, o que está de acordo com o descrito anteriormente por outros autores (Longton e LeGrys, 1981; Zeleznak e Hoseney, 1986).

VI. 3.1.3. Efeito das pentosanas hidrossolúveis no comportamento viscoelástico do amido

O efeito das PHS nas propriedades reológicas do amido foi estudado em dispersões de amido a 50% (m/m) e a 80% (m/m) de hidratação (descritas anteriormente § VI.2.2), tendo-se testado concentrações finais de 0,2 % (m/m), 0,5 % (m/m) e 1% (m/m) de PHS. As amostras de PHS predominantemente utilizadas neste estudo foram as PHS originais, ou seja, as que não foram submetidas ao tratamento de purificação (i.e. redução do teor de proteínas). A variação dos valores de G' com a temperatura é apresentada nas Figuras 6.8 e 6.9 para os sistemas a 50% (m/m) e a 80% (m/m) de hidratação, respectivamente. A Figura 6.8 apresenta ainda uma ampliação da zona de vizinhança do início da gelatinização do amido, para cada variedade, permitindo uma melhor visualização do efeito das PHS na temperatura de gelatinização, definida de acordo com o critério reológico anteriormente referido.

Durante o aquecimento, os sistemas de amido com pentosanas hidrossolúveis (PHS) apresentaram um comportamento com um perfil idêntico ao dos sistemas isolados de amido. Em ambos os sistemas com diferentes níveis de hidratação, a adição de PHS reflectiu-se no aumento da temperatura de gelatinização (T_{gel}) e na diminuição do valor de

G' no ponto máximo da curva ($G'_{\text{máx}}$), não se verificando alterações significativas na



temperatura correspondente a $G'_{\text{máx}}$ ($T_{G'_{\text{máx}}}$).

Figura 6.8 - Efeito da presença das PHS no comportamento reológico das dispersões de amido; curvas de varrimento de temperatura ($\omega=0.5$ Hz, $\gamma=0.5$ %, 2 °C/min) para dispersões de amido a 50% (m/m) de hidratação das variedades: a) Amazonas e b) Sorraia. PHS-cr representa amostras de amido e PHS de variedades cruzadas (amido SOR + 1%PHS AMA e amido AMA + 1%PHS SOR)

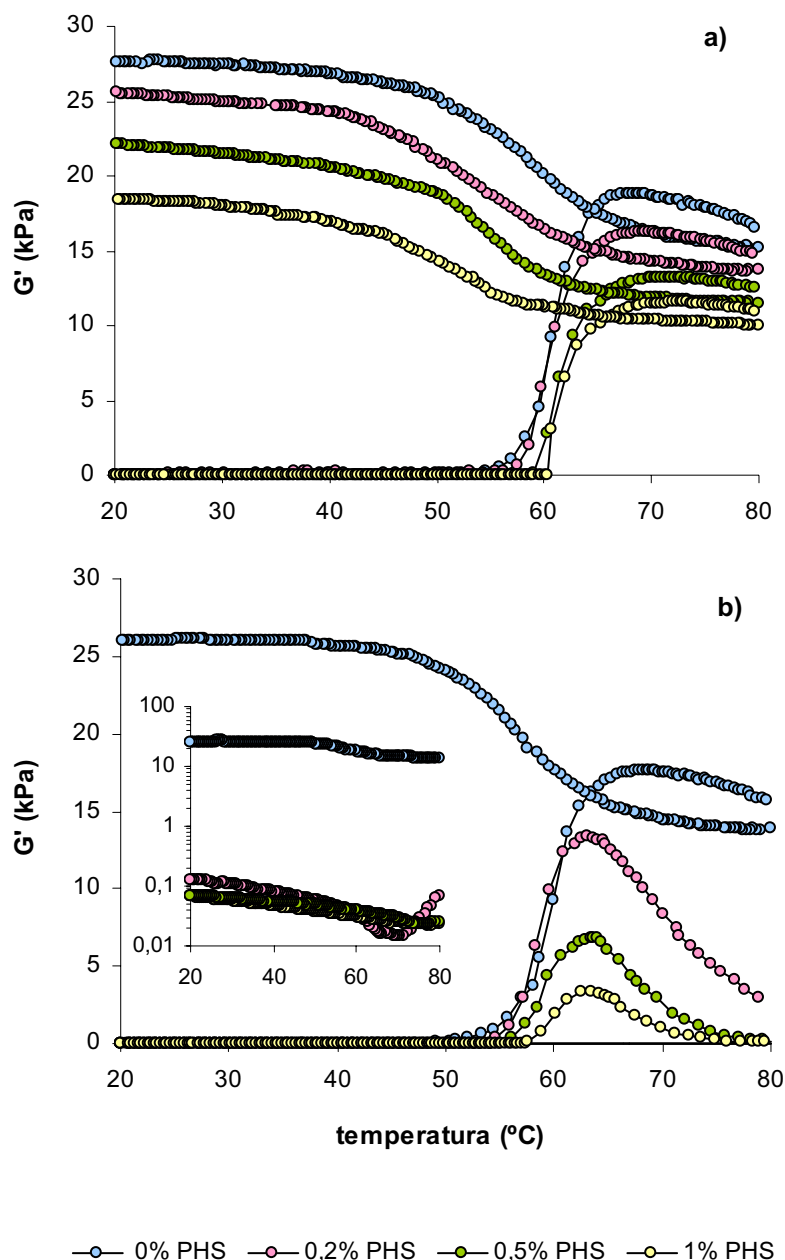


Figura 6.9 - Efeito da presença das PHS no comportamento das dispersões de amido; curvas de varrimento de temperatura ($\omega=0.5$ Hz, $\gamma=0.5$ %, 2 °C/min) para dispersões de amido a 80% (m/m) de hidratação das variedades: a) Amazonas e b) Sorraia; inserto da Figura b apresenta alterações ocorridas durante a etapa de arrefecimento para a dispersão de amido da variedade SOR.

No entanto, para os sistemas da variedade SOR a 80% de hidratação, foi observada uma diminuição da temperatura à qual se atingiu o pico máximo, independentemente da concentração de PHS, efeito este não observado para as misturas a 50% de hidratação. A O

efeito do cruzamento das variedades foi igualmente analisado. A Figura 6.8 apresenta as curvas de aquecimento/arrefecimento para as amostras de amido e PHS de variedades cruzadas, nomeadamente para os sistemas amido AMA+1%PHS (Figura 6.8a) SOR e amido SOR+1%PHS AMA (Figura 6.8b).

Comparativamente aos sistemas homovarietais com 1% PHS, a adição de PHS de variedade cruzada apresentou efeito diferente consoante a origem das mesmas: a adição de 1% PHS da variedade SOR ao amido da variedade AMA (Figura 6.8a) reflectiu-se num aumento mais acentuado de T_{gel} e de $G'_{máx}$, enquanto que a adição de 1% PHS da variedade AMA ao amido da variedade SOR (Figura 6.8b) se reflectiu na atenuação do efeito do acréscimo da T_{gel} e num valor de $G'_{máx}$ mais baixo.

A deslocação da temperatura de gelatinização para temperaturas mais elevadas devido à adição de PHS parece revelar o contexto competitivo entre as PHS e o amido, em relação à água. Como anteriormente já referido, as PHS apresentam uma elevada afinidade pela água, formando soluções bastante viscosas. Quando em dispersão aquosa juntamente com o amido, as PHS competem com o amido pela água (Michniewicz *et al.*, 1991; Vanhamel *et al.*, 1993; Izydorczyk e Biliaderis, 1995), diminuindo assim a quantidade de água disponível para a gelatinização do amido (Yoshimura *et al.*, 1996).

Tal como já referido anteriormente, a água representa um papel fundamental no processo hidrotérmico da gelatinização do amido. Uma diminuição da quantidade de água necessária para a hidratação dos grânulos irá afectar o grau de intumescimento e deformabilidade dos mesmos. Como resultado, o volume de inchamento dos grânulos de amido será menor e a condição de empacotamento apenas será satisfeita a temperaturas mais elevadas, o que se traduz no aumento das temperaturas de gelatinização das dispersões de amido por efeito da adição de PHS. O menor grau de intumescimento dos grânulos de amido reflecte-se ainda na diminuição dos valores de $G'_{máx}$, uma vez que se verifica uma diminuição da extensão das interacções grânulo-grânulo, dado o menor volume dos grânulos de amido.

Tal como observado para os sistemas isolados de amido, todas as misturas analisadas mostraram uma diminuição dos valores de G' , logo após se atingir $G'_{máx}$, devido ao

posterior aquecimento dos sistemas. A diminuição de G' devido ao aquecimento acima da $T_{G'_{\text{máx}}}$ pode ser ilustrada pela quebra de estrutura total relativa (QETR) dada pela relação:

$$\text{QETR} = (G'_{\text{máx}} - G'_{80^{\circ}\text{C}, 10\text{min}}) / G'_{\text{máx}} \quad \text{eq. 6.1}$$

onde $G'_{80^{\circ}\text{C}, 10\text{min}}$ representa o valor de G' obtido após 10 minutos a 80°C .

A Tabela 6.1 apresenta os valores de QETR para os vários sistemas de amido com 0%, 0,2%, 0,5% e 1% de PHS. Na tabela são ainda apresentados dados relativos à recuperação da estrutura após o arrefecimento (REA) e à recuperação da estrutura após o envelhecimento (REE), dados estes que serão analisados posteriormente, ao longo desta secção.

Comparando os valores de QETR dos vários sistemas a 50% de hidratação, verifica-se que, para a variedade SOR, os valores de QETR aumentaram com o aumento da concentração de PHS. Para a variedade AMA verificou-se um resultado contrário, o que reflecte o efeito mais marcante das PHS da variedade SOR na quebra da estrutura dos sistemas de amido. Este efeito é confirmado pelos valores obtidos para os sistemas de variedade cruzada (resultados não apresentados na tabela) para os quais se obtiveram valores de QETR de 80,5% e 65,6% respectivamente para os sistemas amido AMA + 1% PHS SOR e amido SOR + 1% PHS AMA.

Para os sistemas a 80% de hidratação, a quebra de estrutura total relativa mostrou uma tendência geral semelhante à observada a 50% de hidratação. Para a variedade AMA, a QETR diminuiu ligeiramente, enquanto que para a variedade SOR, uma subida drástica dos valores de QETR foi observada, independentemente da quantidade de PHS.

O efeito das PHS no maior valor de QETR observado sobretudo para a variedade SOR, em condições de excesso de hidratação, poderá estar relacionado com o impacto do carácter competitivo das PHS em relação à água na extensão do volume de inchamento dos grânulos e na quantidade de amilose lixiviada para o meio. Uma menor hidratação dos grânulos provocada pela presença de PHS traduz-se quer num menor volume de inchamento dos grânulos quer numa menor quantidade de dissolução de amilose para o meio, o que, no seu conjunto, conduz a um maior enfraquecimento da estrutura, o que se reflecte em valores mais elevados de QETR.

Tabela 6.1 - Parâmetros associados com alterações viscoelásticas ocorridas durante o aquecimento, arrefecimento e envelhecimento de dispersões de amido+PHS a 50% (m/m) e 80% (m/m) de hidratação.^a

Dispersões a 50% (m/m) de Hidratação				
PHS				
	0% (m/m)	0.2% (m/m)	0,5% (m/m)	1% (m/m)
Amido SORRAIA				
QETR (%) ^b	70.8 ± 0.5 <i>x</i>	75.2 ± 1.3 <i>y</i>	79.2 ± 0.1 <i>z</i>	83.2 ± 0.9 <i>w</i>
REA (%) ^c	24 ± 2 <i>x</i>	75 ± 4 <i>y</i>	116 ± 5 <i>z</i>	149 ± 1 <i>w</i>
REE (%) ^d	87 ± 2 <i>x</i>	76 ± 2 <i>yz</i>	72 ± 3 <i>y</i>	77 ± 1 <i>z</i>
Amido AMAZONAS				
QETR (%) ^b	64.9 ± 2.0 <i>x</i>	62.0 ± 0.5 <i>xy</i>	60.3 ± 0.6 <i>yz</i>	57.9 ± 0.8 <i>z</i>
REA (%) ^c	10.0 ± 0.6 <i>x</i>	17.8 ± 0.5 <i>y</i>	18.4 ± 1.3 <i>y</i>	20.5 ± 0.4 <i>z</i>
REE (%) ^d	90.1 ± 0.8 <i>x</i>	47.8 ± 0.9 <i>y</i>	38.6 ± 2.3 <i>z</i>	33.0 ± 1.0 <i>w</i>
Dispersões a 80% (m/m) de Hidratação				
PHS				
	0% (m/m)	0.2% (m/m)	0,5% (m/m)	1% (m/m)
Amido SORRAIA				
QETR (%) ^b	23 ± 2 <i>x</i>	98.0 ± 0.2 <i>y</i>	98.6 ± 0.1 <i>y</i>	98.9 ± 0.1 <i>y</i>
REA (%) ^c	86 ± 2 <i>x</i>	131 ± 8 <i>y</i>	569 ± 9 <i>z</i>	894 ± 3 <i>w</i>
REE (%) ^d	14 ± 1 <i>x</i>	42 ± 2 <i>y</i>	27 ± 2 <i>z</i>	-7.6 ± 0.6 <i>w</i>
Amido AMAZONAS				
QETR (%) ^b	17 ± 2 <i>x</i>	15.3 ± 0.8 <i>xy</i>	13.7 ± 0.8 <i>y</i>	13.1 ± 0.7 <i>y</i>
REA (%) ^c	87 ± 4 <i>x</i>	82 ± 3 <i>x</i>	81 ± 1 <i>x</i>	81 ± 1 <i>x</i>
REE (%) ^d	8 ± 1 <i>x</i>	14 ± 1 <i>y</i>	11 ± 1 <i>x</i>	5 ± 1 <i>z</i>

^a Média ± (desvio padrão) de três ensaios. Valores na mesma linha seguidos por uma letra diferente são significativamente diferentes ($P > 0,5$)

^b Quebra de estrutura total relativa devido ao aquecimento acima da $T_{G'max}$

^c Recuperação relativa da estrutura durante o arrefecimento

^d Recuperação relativa da estrutura durante o envelhecimento

À medida que ocorre a desintegração dos grânulos de amido, por aquecimento, uma maior quantidade de componentes intragranulares são lixiviados para a fase contínua, formando-se uma pasta ou um gel dependendo da concentração. Durante o arrefecimento dos

sistemas (80-20°C), observa-se uma recuperação da estrutura pela formação de uma rede entre as cadeias de amilose, numa extensão dependente da quantidade de amilose e amilopectina lixiviadas para o meio (Eliasson e Bohlin, 1982; Jane *et al.*, 1999). A recuperação relativa da estrutura (aumento de G') durante o arrefecimento (REA), foi definida como:

$$REA = (G'_{20^{\circ}\text{C}} - G'_{80^{\circ}\text{C}, 10 \text{ min}}) / G'_{80^{\circ}\text{C}, 10 \text{ min}} \quad \text{eq. 6.2}$$

onde $G'_{20^{\circ}\text{C}}$ representa o valor de G' após o arrefecimento do sistema a 20°C, e $G'_{80^{\circ}\text{C}, 10 \text{ min}}$ representa o valor de G' obtido após 10 minutos a 80°C.

Pela análise da Tabela 6.1, verifica-se que a recuperação relativa da estrutura durante o arrefecimento foi também afectada pela presença de PHS, tendo esta ocorrido num maior grau quando na presença de PHS. A recuperação da estrutura foi bastante mais pronunciada para a mistura amido+PHS da variedade SOR a 80% de hidratação, comparativamente com as outras misturas e até mesmo com os sistemas de amido isolado.

Após arrefecimento até 20°C, o efeito das pentosanas no comportamento viscoelástico dos géis de amido foi estudado recorrendo a ensaios de varrimento de frequência (Figuras 6.10, 6.11 e 6.12). A Figura 6.10 apresenta o efeito das PHS para ambas as variedades de amido, para dispersões preparadas a 50% de hidratação. As Figuras 6.11 e 6.12 apresentam o efeito das PHS nas dispersões de amido a 80% de hidratação, para as variedades SOR e AMA, respectivamente.

Para 50% de hidratação, a presença de PHS não afectou significativamente o comportamento viscoelástico dos géis de amido da variedade AMA (Figura 6.10b), apesar das alterações ocorridas durante os processos de aquecimento e arrefecimento. Porém, o mesmo não se verificou relativamente aos géis de amido SOR (Figura 6.10a). Embora não se tenham verificado alterações significativas no módulo de conservação, os valores de G'' aumentaram devido à presença das PHS, o que se traduz numa redução do carácter elástico dos sistemas (aumento de $\tan \delta$).

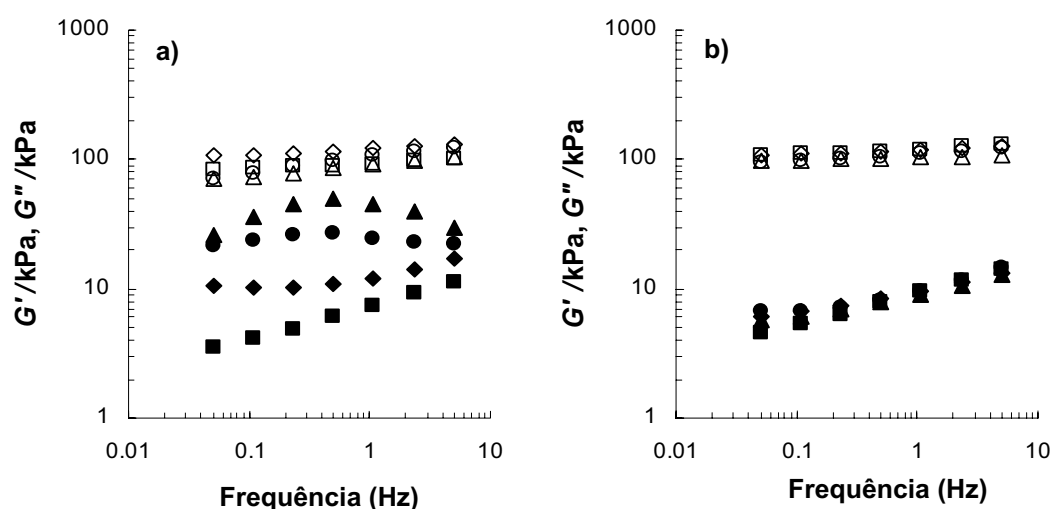


Figura 6.10 - Variação dos módulos viscoelásticos em função da frequência de oscilação para as misturas de amido+PHS a 50% (m/m) de hidratação das variedades (a) Sorraia e (b) Amazonas. Símbolos vazios representam o módulo de armazenamento (G' /kPa), e símbolos cheios representam módulo de perda (G'' /kPa). Amostras gelatinizadas *in situ* e analisadas por ensaios de varrimento de frequência a 20 °C. (,) 0% PHS, (\diamond ,) 0.2% PHS, (\circ) 0,5% PHS, e (Δ , \diamond) 1% PHS.

A adição de PHS nas dispersões de amido a 80% de hidratação conduziu a resultados bastante diferentes. No caso da variedade SOR (Figura 6.11), a adição de PHS às amostras de amido resultou numa diminuição bastante acentuada dos valores de G' (Figura 6.11a) e no aumento de $\tan \delta$ (Figura 6.11b), manifestando, mais uma vez, o aumento do carácter viscoso dos géis amido+PHS.

No caso da variedade AMA (Figura 6.12), a adição de PHS apenas conduziu ao aumento dos valores de G'' (os valores de G' praticamente não se alteraram), evidenciando um aumento do carácter viscoso dos sistemas (subida dos valores de $\tan \delta$).

O efeito das PHS no comportamento viscoelástico dos géis de amido depende da variedade de origem das PHS. Este aspecto é mais uma vez ilustrado nas Figuras 6.11 e 6.12 através dos espectros mecânicos das misturas de variedades cruzadas com 0.5% PHS. A adição de PHS da variedade AMA ao amido SOR (Figura 6.11) exerceu um efeito menos pronunciado do que a adição de PHS da variedade SOR. Por sua vez, a adição de PHS da

variedade SOR ao amido da variedade AMA (Figura 6.12) contribuiu para uma diminuição bastante mais acentuada dos valores de G' e consequente aumento dos valores de $\tan \delta$. Um efeito diferente nas propriedades viscoelásticas do amido consoante a origem das pentosanas foi igualmente reportado por outros autores (Sasaki *et al.*, 2000).

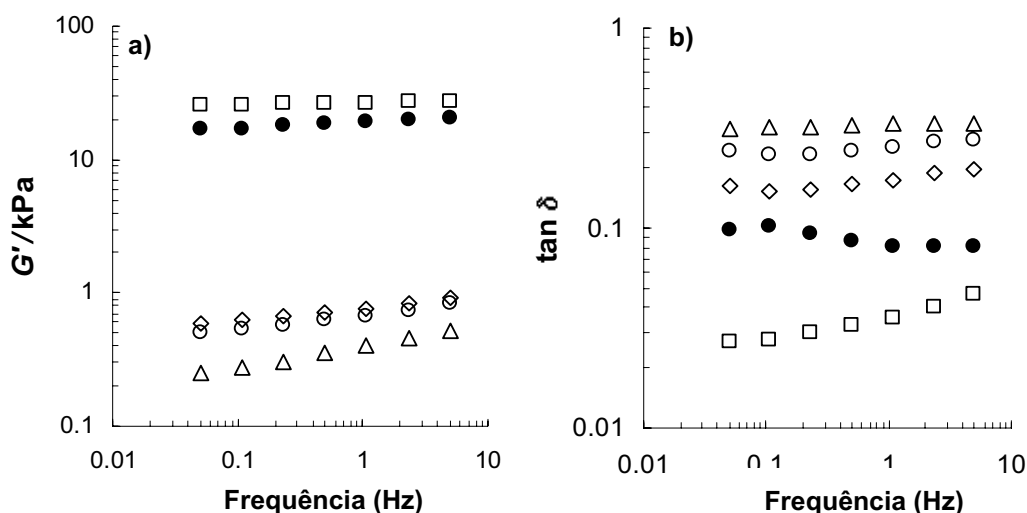


Figura 6.11 - Efeito da adição das PHS nas propriedades viscoelásticas do amido da variedade Sorraia a 80% (m/m) de hidratação. Variação (a) do módulo de conservação (G' /kPa) e (b) da tangente ao ângulo de perda ($\tan \delta$ (G''/G')) em função da frequência de oscilação para as misturas amido+PHS. Amostras gelatinizadas *in situ* e analisadas através de ensaios de varrimento de frequência a 20°C (0,5 % γ), logo após o tratamento térmico 20-80-20°C. - 0% PHS, \diamond - 0.2% PHS, \circ - 0,5 % PHS, e \triangle - 1 % PHS; ∇ - 0,5 % PHS da variedade Amazonas.

O marcado e negativo efeito das PHS da variedade SOR na gelificação do amido SOR poderá estar relacionado com a incompatibilidade existente entre as PHS e as cadeias constituintes do amido, sobretudo amilose (Alloncle e Doublier, 1991). Quando dois polímeros diferentes são misturados, o comportamento da dispersão final depende da interacção entre os dois polímeros. Do ponto de vista termodinâmico, polímeros quimicamente diferentes tendem a ser incompatíveis, podendo ocorrer a separação de fases, o que pode afectar as propriedades viscoelásticas do gel formado pela mistura (Morris, 1990).

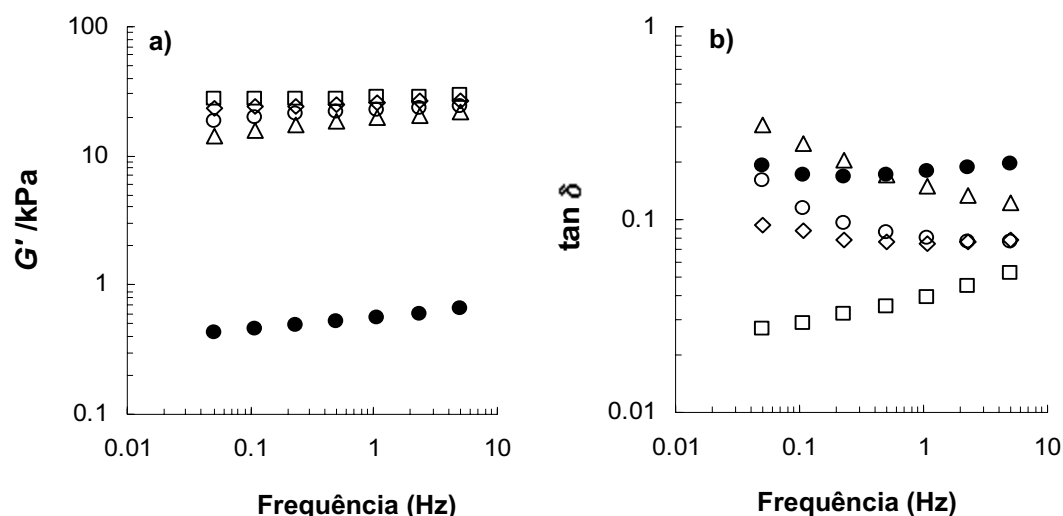


Figura 6.12 - Efeito da adição das PHS nas propriedades viscoelásticas do amido da variedade Amazonas a 80% (m/m) de hidratação. Variação (a) do módulo de conservação (G' /kPa) e (b) da $\tan \delta$ (G''/G') em função da frequência de oscilação para as misturas amido+PHS. Amostras gelatinizadas *in situ* e analisadas através de ensaios de varrimento de frequência a 20°C (0,5 % γ), logo após o tratamento térmico 20-80-20°C. - 0% PHS, \diamond - 0.2% PHS, \circ - 0,5 % PHS, e \triangle - 1 % PHS; Δ - 0,5 % PHS da variedade Sorraia.

A adição de hidrocolóides a sistemas de amido pode influenciar quer a fase contínua (amilose) quer a fase dispersa (amilopectina) pela inibição da formação de uma rede tridimensional entre a amilose e a amilopectina (Kim e D'Appolonia, 1977a; Yoshimura *et al.*, 1996). Este efeito poderá ter estado na origem dos resultados observados para os sistemas amido+PHS da variedade SOR, a 80% de hidratação (Figura 6.11). A adição de PHS deverá ter impedido a associação das moléculas de amilose, formando-se uma rede de polímeros “inter penetrantes”, onde as cadeias das PHS terão contribuído para a predominância de um comportamento viscoso, em detrimento do desenvolvimento do carácter elástico geralmente exibido pelos géis de amilose.

As PHS são caracterizadas por valores relativamente baixos de concentração de interpenetração macromolecular (do inglês *critical coil overlap concentration*), C^* (Izydorczyk e Biliaderis 1995). Assim, tendo em conta a quantidade de água nestes sistemas, e considerando que a lixiviação da amilose terá ocorrido numa extensão

apreciável para as misturas com maior percentagem de hidratação, ambas as concentrações destes polissacarídeos, na fase contínua, encontram-se acima da concentração de interpenetração macromolecular, i.e. a concentração crítica para que ocorram os enovelamentos, o que é favorável para que ocorra a separação dos polímeros (De Gennes 1979; Kalichevsky *et al.*, 1986). Uma explicação mais satisfatória poderá então ser proposta, baseada em ambos os componentes na mistura, devido à usualmente positiva energia livre da interação entre os polímeros (De Gennes 1979). É assim sugerido que o marcado efeito detrimental das PHS na gelificação do amido estará relacionado com a incompatibilidade existente entre as PHS e as cadeias constituintes do amido, especialmente a amilose.

O diferente efeito observado entre as variedades de PHS parece sugerir que os diferentes efeitos observados na gelatinização e gelificação dos sistemas de amido estarão relacionados essencialmente com diferenças de estrutura e/ou de composição das amostras de PHS do que com o amido por si só. Considerando que ambas as variedades de PHS apresentaram uma composição semelhante (ver § II.3.3.3), o efeito mais marcante observado para as PHS da variedade SOR poderá primeiramente ser atribuído ao seu maior tamanho molecular tal como deduzido pela maior viscosidade intrínseca.. Porém, tendo em conta a relativa complexidade das amostras de PHS compostas predominantemente por arabinoxilanas, a influência de outros componentes, sobretudo a fracção de proteínas hidrossolúveis, terá que ser tomada em conta.

Após redução do teor em proteínas das amostras de PHS utilizadas, um diferente efeito sobre a gelificação do amido foi verificado. A Figura 6.13 apresenta um exemplo deste comportamento para o amido da variedade SOR e para as misturas com 0,5 % PHS. A adição de PHS SOR purificadas conduziu a uma diminuição menos acentuada do valor de G' do que a adição de PHS SOR originais (não purificadas).

A amostra preparada com PHS AMA purificadas conduziu a valores de G' bastante semelhantes aos valores apresentados pela amostra com PHS SOR purificadas, e ligeiramente inferiores aos valores apresentados pela amostra preparada com PHS AMA originais. O diferente comportamento apresentado após a purificação das PHS deverá estar relacionado com a eliminação das proteínas residuais presentes nas amostras de PHS.

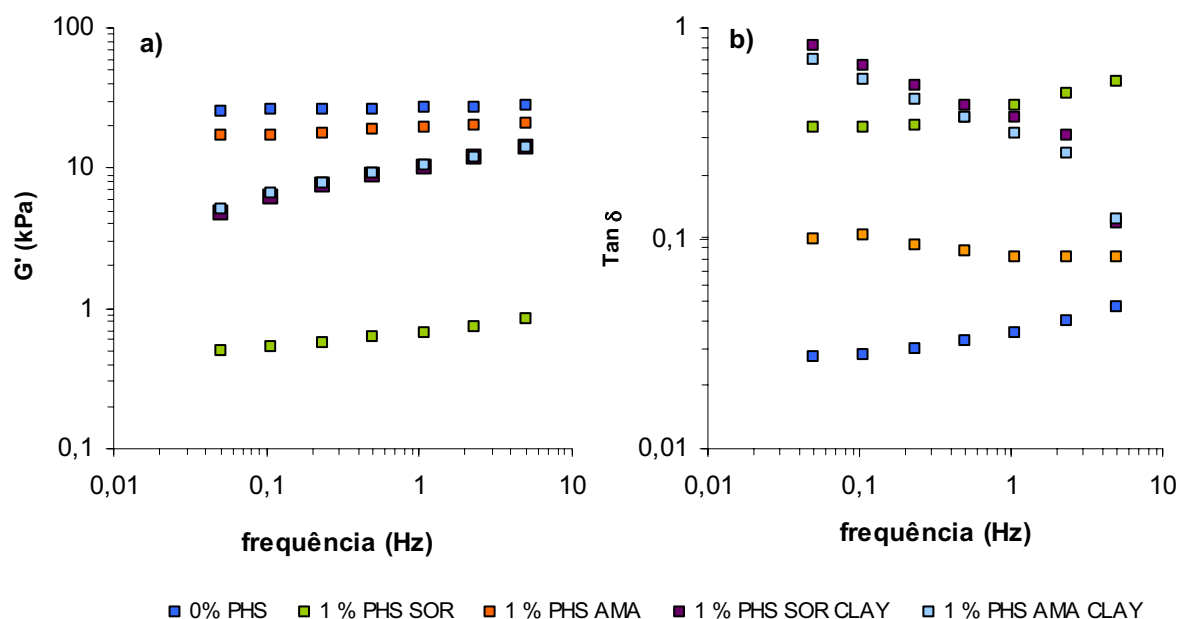


Figura 6.13 - Efeito da adição de 0,5 % PHS após redução do teor de proteínas nas propriedades viscoelásticas do amido da variedade Sorraia a 80% (m/m) de hidratação. Variação (a) do módulo de conservação (G' /kPa) e (b) da $\tan \delta$ (G''/G') em função da frequência de oscilação para as misturas amido+PHS. Amostras gelatinizadas *in situ* e analisadas através de ensaios de varrimento de frequência a 20°C (0,5 % γ), logo após o tratamento térmico 20-80-20°C. PHS SOR CLAY - representa amostra de amido SOR+PHS da variedade SOR purificadas com argila; PHS AMA CLAY - representa amostra de amido SOR+PHS da variedade AMA purificadas com argila.

Durante o envelhecimento dos géis a 20°C, as misturas de amido+PHS apresentaram uma evolução qualitativamente semelhante à dos sistemas isolados de amido (resultados não apresentados) para o mesmo nível de hidratação. No sentido de comparar a evolução da estrutura dos sistemas durante o envelhecimento, avaliou-se a recuperação relativa da estrutura (REE), ao fim de 16h de envelhecimento, determinada por:

$$REE = (G'_{20^\circ\text{C}, 16\text{ h}} - G'_{20^\circ\text{C}}) / G'_{20^\circ\text{C}} \quad \text{eq. 6.3}$$

onde $G'_{20^{\circ}\text{C}}$ representa o valor de G' após o arrefecimento do sistema a 20°C , e $G'_{20^{\circ}\text{C},16\text{h}}$ representa o valor de G' obtido após 16 horas de envelhecimento. Os valores de REE estão apresentados na Tabela 6.1.

De um modo geral, a adição das PHS afectou a rigidez dos sistemas após 16 horas de envelhecimento, tal como é deduzido pela variação dos valores de REE. Nas misturas a 50% de hidratação verifica-se uma diminuição generalizada da rigidez dos sistemas devido à presença das PHS, tendo, interessantemente, este efeito sido bastante mais pronunciado para os sistemas amido+ PHS da variedade AMA. No caso das misturas em condições de excesso de hidratação, os sistemas não apresentaram grande evolução, tendo-se no entanto observado valores de rigidez mais elevados para as misturas amido+PHS da variedade SOR com 0,5 % e 1 % de PHS. Estes resultados parecem sugerir o efeito benéfico das PHS na diminuição da extensão do processo de retrogradação do amido. A adição de PHS não reduz a taxa de retrogradação, apenas parece actuar sobre a disponibilidade de cadeias de amilose e amilopectina disponíveis para a recristalização (Longton e LeGrys, 1981; Gudmundsson *et al.*, 1991; Eliasson e Larsson, 1993). Considerando a hipótese de que a adição de PHS inibe a solubilização de amilose para a fase contínua, durante o envelhecimento dos géis, a quantidade de componentes de amido disponíveis para a cristalização do amido é também menor, pelo que a extensão da retrogradação diminui. A formação de um possível complexo amido-pentosanos poderá ainda restringir todo o processo de retrogradação dos géis de amido (Jankiewicz e Michniewickz, 1987).

VI. 3.2. Efeito das pentosanas hidrossolúveis nas propriedades térmicas do amido

A técnica de calorimetria diferencial de varrimento (DSC) é frequentemente utilizada para estudar as transições de fase em sistemas aquosos de amido, tendo como vantagem possibilitar a análise destes processos ao longo de uma vasta gama de temperaturas e de teores de água (Stevens e Elton, 1971; Biliaderis *et al.*, 1980; Biliaderis, 1983; Liu e Lelièvre, 1993; Okechuckwu e Rao, 1995, Rolee e LeMeste, 1999). No sentido de complementar os resultados obtidos no estudo reológico, realizaram-se alguns ensaios de DSC, com o objectivo de se determinar o efeito das PHS sobre as propriedades térmicas do amido, nomeadamente quando sofre gelatinização e retrogradação.

A Figura 6.14 apresenta um exemplo de um termograma obtido. Nas condições experimentais usadas, foram observadas duas transições endotérmicas indicadas na Figura pelas letras **A** e **B**. A primeira transição corresponde à gelatinização do amido, e a segunda à dissociação do complexo de amilose-lípidos. As transições endotérmicas são caracterizadas por uma temperatura de início (T_o), uma temperatura no pico da transição (T_p), uma temperatura no fim (T_c) e por uma variação de entalpia associada à transição (ΔH) (Stevens e Elton, 1971).

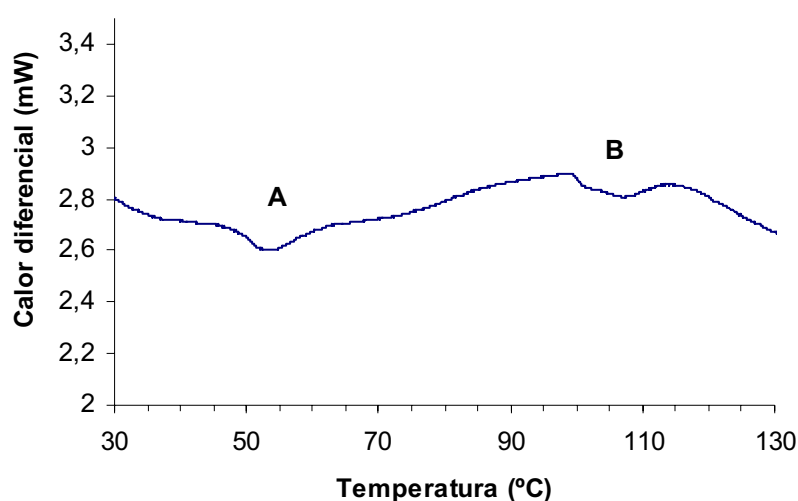


Figura 6.14 - Exemplo de termograma obtido na análise por calorimetria diferencial de varrimento para uma amostra de amido da variedade Sorraia, a 50% (m/m) de hidratação. As letras A e B representam as transições endotérmicas correspondentes à gelatinização do amido e à dissociação do complexo de amilose-lípidos, respectivamente.

A Tabela 6.2 apresenta os valores obtidos para as temperaturas correspondentes às curvas das transições endotérmicas da gelatinização e do complexo amilose-lípidos bem como as respectivas entalpias de transição, para dispersões de amido e amido+PHS a 50% e a 80% de hidratação. Para as amostras a 50% de hidratação são também apresentados os resultados obtidos do segundo varrimento de temperatura efectuado após armazenamento das amostras gelatinizadas durante 7 dias a 4°C.

Tabela 6.2 - Temperaturas correspondentes às curvas das transições endotérmicas da gelatinização e do complexo amilose-lípidos bem como as respectivas entalpias de transição para as misturas amido+PHS a 50% e 80% de hidratação^a

Dispersões a 50% (m/m) de Hidratação						
	AMA			SOR		
	0 % PHS	0,5 % PHS	1 % PHS	0 % PHS	0,5 % PHS	1 % PHS
Gelatinização						
T _{oG} (°C)	50.4 ± 0.7	51.7 ± 0.2	52.1 ± 0.3	47.0 ± 0.3	48.2 ± 0.2	49.9 ± 0.6
T _{pG} (°C)	57.0 ± 0.6	57.5 ± 0.7	58.9 ± 1.0	53.4 ± 0.2	54.3 ± 0.7	55.9 ± 0.3
ΔH _G /Jg ⁻¹ (b)	2.2 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.3	2.9 ± 0.6	1.9 ± 0.1	2.6 ± 0.2
Dissociação Amilose-Lípido						
T _{oAL} (°C)	104.2 ± 1.0	104.4 ± 2.2	101.7 ± 0.5	100.8 ± 1.3	103.4 ± 0.6	104.8 ± 1.1
T _{pAL} /°C	111.1 ± 1.0	110.5 ± 0.8	109.5 ± 1.0	106.6 ± 0.6	109.8 ± 1.0	110.9 ± 0.2
ΔH _{AL} /Jg ⁻¹ (b)	2.0 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.6 ± 0.4	1.3 ± 0.4	0.73 ± 0.2	0.76 ± 0.06
Retrogradação						
T _{oR} (°C)	41.3 ± 0.4	41.5 ± 2.2	42.5 ± 0.6	38.6 ± 1.0	41.7 ± 0.9	45.1 ± 1.0
T _{pR} (°C)	49.0 ± 0.6	50.6 ± 0.9	53.0 ± 0.8	44.3 ± 0.8	48.4 ± 0.6	51.8 ± 1.3
ΔH _R /Jg ⁻¹ (b)	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.3	0.50 ± 0.07	0.48 ± 0.09	0.33 ± 0.07	0.28 ± 0.04
2ª Dissociação Amilose-Lípido						
T _{oAL} (°C)	109.9 ± 0.6	108.7 ± 0.8	108.1 ± 0.7	106.1 ± 1.7	102.4 ± 0.3	103.6 ± 0.6
T _{pAL} /°C	113.2 ± 0.8	112.8 ± 0.9	113.2 ± 0.5	110.3 ± 2.3	107.6 ± 0.4	108.8 ± 0.4
ΔH _{AL} /Jg ⁻¹ (b)	0.41 ± 0.12	0.40 ± 0.20	0.44 ± 0.12	0.57 ± 0.04	0.53 ± 0.1	0.47 ± 0.06
Dispersões a 80% (m/m) de Hidratação						
	AMA			SOR		
	0 % PHS	1 % PHS	2 % PHS	0 % PHS	1 % PHS	2 % PHS
Gelatinização						
T _{oG} (°C)	56.0 ± 0.3	57.2 ± 0.2	57.4 ± 0.3	48.9 ± 0.9	51.8 ± 1.2	52.5 ± 0.6
T _{pG} (°C)	59.2 ± 0.5	59.8 ± 0.4	60.9 ± 0.7	56.1 ± 0.2	57.7 ± 0.2	58.0 ± 0.2
ΔH _G /Jg ⁻¹ (b)	5.8 ± 0.4	3.4 ± 0.3	2.2 ± 0.2	11.1 ± 1.2	3.7 ± 0.7	1.9 ± 0.2
Dissociação Amilose-Lípido						
T _{oAL} (°C)	n.d. (c)	n.d.	n.d.	45.7 ± 0.1	n.d.	n.d.
T _{pAL} /°C	n.d.	n.d.	n.d.	102.2 ± 0.9	n.d.	n.d.
ΔH _{AL} /Jg ⁻¹ (b)	n.d.	n.d.	n.d.	2.4 ± 0.3	n.d.	n.d.

^a Média ± (desvio padrão) de medições em triplicado;

^b Com base na massa seca do amido

^c Não detectável

Os resultados obtidos no DSC parecem estar de acordo com os resultados obtidos nos estudos reológicos. O amido da variedade SOR apresentou temperaturas do início de gelatinização (T_{oG}) inferiores às do amido da variedade AMA, e a adição de PHS conduziu a um aumento generalizado de T_{oG} . A 50% de hidratação, apesar da variação observada em relação a T_{oG} , não foram encontradas diferenças significativas nos valores da entalpia de gelatinização (ΔH_G) quer entre as variedades de amido, quer entre os sistemas de amido isolado e sistemas de amido+PHS. O mesmo não aconteceu relativamente à transição associada à dissociação do complexo amilose-lípidos. Apesar da adição de PHS não ter alterado a temperatura de início da transição, a entalpia de transição (ΔH_{AL}) diminuiu independentemente da quantidade de PHS. Este resultado indica que a adição de PHS facilita a dissociação do complexo amilose-lípidos.

O aumento do teor de água nos sistemas resultou num aumento generalizado de T_{oG} e de ΔH_G , tendo o efeito sido mais pronunciado para o amido SOR. A 80% de hidratação, a adição de PHS resultou numa diminuição de ΔH_G relativamente aos sistemas de amido isolado, sendo o efeito mais significativo também para as amostras da variedade SOR. Para este teor de hidratação, apenas se conseguiu detectar a endotérmica de transição do complexo amilose-lípidos para a variedade SOR. Relativamente a esta transição, verificou-se que os valores de T_{oAL} e T_{pAL} se deslocaram para temperaturas inferiores, tendo-se no entanto verificado um aumento das entalpias de transição, relativamente aos sistemas com uma percentagem de hidratação intermédia.

As amostras sujeitas a gelatinização por aquecimento no calorímetro foram armazenadas, nos mesmos cadinhos fechados, durante 7 dias a 4°C, e novamente sujeitas à mesma rampa de temperatura no calorímetro DSC. Verificou-se que as temperaturas associadas às transições endotérmicas, após armazenamento e envelhecimento do gel e provável retrogradação, deslocaram-se para temperaturas mais baixas, tendo também apresentado valores de ΔH_R mais baixos. A endotérmica associada ao complexo amilose-lípidos deslocou-se para temperaturas mais elevadas, observando-se igualmente uma diminuição dos valores de ΔH_{AL} . É sabido que quando os grânulos de amido gelatinizam, eles perdem a sua ordem e cristalinidade. Após armazenamento a baixas temperaturas e durante um longo tempo, a estrutura ordenada não é completamente recuperada (Biliaderis, 1992), pelo que a quantidade de energia necessária para a transição de fase é menor. As entalpias de

transição das misturas amido+PHS foram semelhantes ou ligeiramente inferiores aos valores obtidos para os sistemas de amido isolado. Porém, a adição de PHS deslocou as temperaturas das endotérmicas após a retrogradação para valores mais elevados, alargando a gama de temperaturas da transição.

Os resultados obtidos após o segundo aquecimento devem ser considerados com algum cuidado, devido aos pequenos picos endotérmicos obtidos e dada a pouca sensibilidade do aparelho de DSC. Porém, estes resultados podem ajudar a concluir que nas condições testadas, a retrogradação não é promovida pela presença de PHS.

VI. 3.3. Caracterização das amostras de amido e amido com pentosanas hidrossolúveis por RMN de sólidos

A caracterização dos sistemas de amido isolado e de amido+PHS foi complementada através de estudos de espectroscopia RMN de sólidos. Para tal foram realizados ensaios em amostras secas e amostras hidratadas a 50% (m/m) com D₂O, para as quais se registaram espectros de ¹³C-CP/MAS e espectros de ¹H-MAS. As fracções isoladas de PHS foram caracterizadas apenas no seu estado seco, tendo como objectivo principal o reconhecimento de picos indicativos relevantes para a distinção entre as PHS das duas variedades, e entre as PHS e o amido. No estudo das amostras amido+PHS apenas foi estudada a mistura amido + 0,5% PHS para a variedade Sorraia.

VI. 3.3.1. Caracterização por espectroscopia de ¹³C - CP/MAS

VI. 3.3.1.1. Caracterização das amostras de amido e PHS no estado seco

As amostras de amido e de PHS foram primeiramente analisadas no estado seco (Figura 6.15) numa tentativa de se conseguirem discriminar sinais diferenciadores das duas fracções de polissacarídeos. Na Figura 6.15 os principais sinais observados estão numerados de modo a facilitar a sua identificação, e as respectivas atribuições estão apresentadas na Tabela 6.3. As atribuições dos sinais ¹³C foram baseadas em trabalhos publicados anteriormente sobre a caracterização por RMN de ¹³C do amido (Veregin *et al.*, 1986; Horii *et al.*, 1987; Morrison *et al.*, 1993a; Morgan *et al.*, 1995) e de arabinoxilanas

(Annison *et al.*, 1992; Izydorczyk e Biliaderis, 1992; Larsson *et al.*, 1997; Roels *et al.*, 1999; Roubroeks *et al.*, 2000).

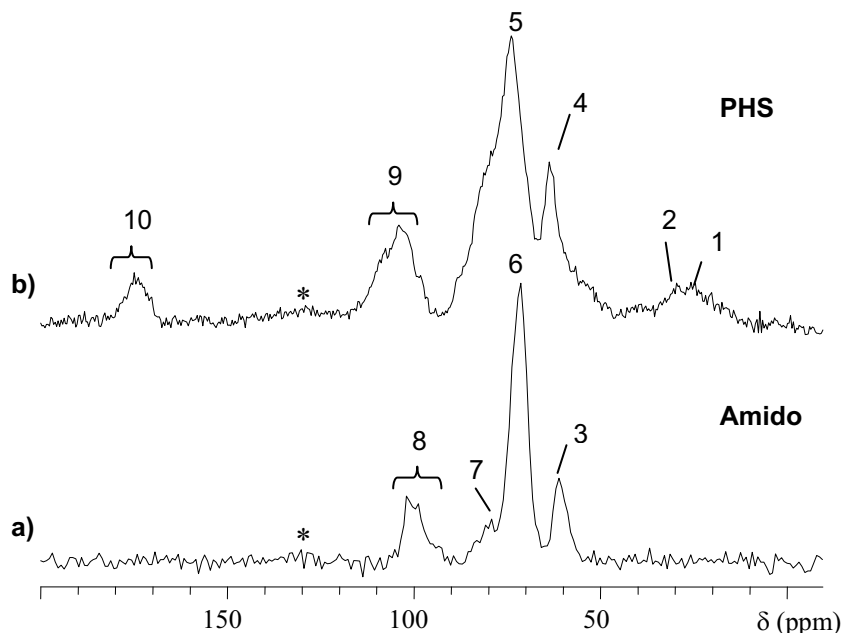


Figura 6.15 - Espectros ^{13}C /CPMAS de amostras secas de a)- amido Sorraia, ns=138, LB=20 e b)- pentosanas hidrossolúveis (PHS) Sorraia, ns= 16832, LB=20; SR= 6 kHz; *- bandas laterais de rotação; algarismos relacionam-se com a atribuição de grupos funcionais (ver texto).

Comparando os espectros de ^{13}C -CP/MAS das amostras secas de PHS e amido, observa-se que ambos os espectros são dominados essencialmente por três picos, apresentando um perfil semelhante. No entanto, o espectro das PHS apresenta-se mais largo do que o correspondente espectro obtido para o amido, reflectindo a baixa cristalinidade relativa das PHS.

No espectro do amido (Figura 6.15a), os sinais dominantes são atribuídos aos carbonos dos anéis de glucose das cadeias de amilose e amilopectina constituintes do amido. A 61,9 ppm (pico 3) observa-se a banda característica dos átomos do carbono 6 (C6), seguindo-se o pico mais intenso, a 72,0 ppm (pico 6), característico dos carbonos C2 a C5, e a 99,5-102,6 ppm (pico 8) observa-se a ressonância característica do carbono C1. O espectro da amostra

de amido apresenta ainda a cerca de 79,9 ppm um pico parcialmente resolvido (pico 7), geralmente atribuído ao carbono C-4 dos anéis de glucose, o que sugere a presença da conformação V do amido (Gidley e Bociek, 1985; Morgan *et al.*, 1995). A conformação tipo V é característica dos amidos não ceráceos, cujo padrão é geralmente atribuído à organização das cadeias de amilose sob a forma de hélices simples apresentando cavidades hidrofóbicas que podem incluir moléculas tais como cadeias de ácidos gordos, formando os já referidos complexos de amilose-lípidos (Kugimya e Donovan, 1981; Morrisson *et al.*, 1993a). Perfis idênticos aos aqui apresentados para o amido, mostrando a presença dos mesmos sinais, foram apresentados anteriormente por outros autores (Gidley e Bociek, 1985, 1988; Veregin *et al.*, 1986; Horii *et al.*, 1987; Morrison *et al.*, 1993c; Morgan *et al.*, 1995).

Tabela 6.3 - Atribuições dos sinais dos espectros de RMN de ^{13}C do estado sólido das amostras de amido e pentosanas hidrossolúveis (PHS) com base em trabalhos publicados anteriormente (Veregin *et al.*, 1986; Horii *et al.*, 1987; Annison *et al.*, 1992; Izydorczyk e Biliaderis, 1992; Morrison *et al.*, 1993a; Morgan *et al.*, 1995; Larsson *et al.*, 1997; Roels *et al.*, 1999; Roubroeks *et al.*, 2000).

Pico	δ (ppm)	Atribuição	
		Tipo de carbono	Componente
1	25,9	- $(\text{CH}_2)_n$ -	Proteína hidrossolúvel
2	29,9	- $(\text{CH}_2)_n$ -	Proteína hidrossolúvel
3	61,9	- COOH -	C6 amido
4	63,8	- CH_2O -	C5 xilose, arabinose, PHS
5	74,0	- CHOH -	C2, C3, C4 xilose, arabinose, PHS
6	72,1	- CHOH -	C2, C3, C5 amido
7	79,9	- CHOH -	C4 glucopiranoose amido
8	97-103	- CH -	C1 glucopiranoose amido
9	98- 110	- CH -	C1 xilose, arabinose, PHS
10	170-177	- COO -	Proteína hidrossolúvel, PHS

No espectro das PHS (Figura 6.15b) os três picos dominantes são atribuídos aos carbonos dos anéis de xilose e de arabinose constituintes das cadeias de arabinoxilanas das PHS. A 63 ppm (pico 4) observa-se o sinal derivado dos carbonos C5 dos anéis de arabinose e de xilose, a 70-90 ppm (pico 5) observa-se o sinal mais intenso derivado dos carbonos C2-C4, e a 92-110 ppm (pico 9) observa-se o sinal derivado da contribuição dos carbonos C1. O espectro das PHS apresenta ainda a 25-30 ppm e a 170-180 ppm a presença de sinais indicativos da presença de proteína residual na amostra. As PHS aqui analisadas foram as amostras de PHS originais, contabilizando na sua composição cerca de 20-26 % de proteína.

VI. 3.3.1.2. Efeito da hidratação das amostras de amido

A hidratação das amostras de amido a 50% D₂O (m/m) conduziu a algumas alterações no espectro ¹³C-CP/MAS, tal como se pode observar na Figura 6.16 onde se apresentam os espectros para a amostra de amido SOR no estado seco e no estado hidratado. Nesta secção apenas é apresentado o efeito da hidratação das amostras de amido isolado (sem adição de PHS). O efeito da hidratação das PHS não foi analisado.

De um modo geral, a hidratação melhorou a resolução do espectro de ¹³C do amido, um efeito igualmente observado por outros autores (Fyfe *et al.*, 1984; Tanner *et al.*, 1987) em amostras de amido. A hidratação promoveu uma diminuição da largura de banda dos sinais dos carbonos C1 (de 994 Hz para 455 Hz) e C6 (de 435 Hz para 209 Hz). O sinal dos carbonos C2-C5, porém, aumentou em termos de largura de banda (de 513 Hz para 545 Hz) como resultado de uma maior desorganização molecular devido ao efeito da plasticização da água. Com a hidratação do amido destaca-se o aparecimento do sinal a 73,4 ppm, sob a forma de um ombro na banda dos carbonos C2-C5, atribuído à ressonância do carbono C3 e associado a uma conformação helicoidal da amilose, e a alteração da configuração do sinal do carbono C1 como resultado de uma diferente organização molecular promovida pela hidratação. Resultado semelhante foi observado para o amido da variedade AMA.

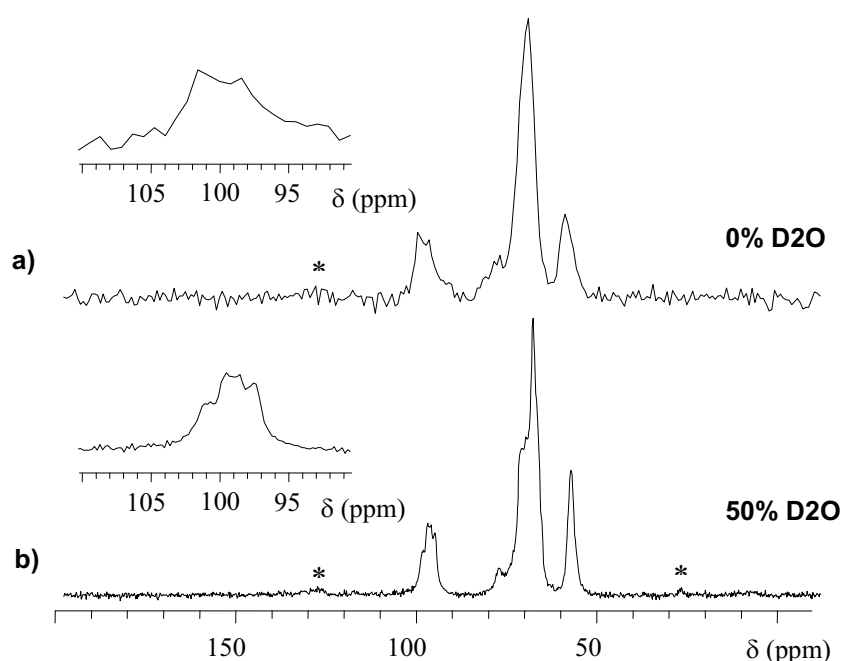


Figura 6.16 - Efeito da hidratação do amido da variedade SOR nos espectros de ^{13}C -CP/MAS, SR= 6 kHz; a)- amido SOR seco ns= 132, LB=20 e b)- amido SOR hidratado 50% D₂O (m/m), ns= 5032, LB=20; inserts apresentam a ampliação do sinal do carbono C1; *- bandas laterais de rotação.

VI. 3.3.1.3. Efeito do tratamento térmico 20-80-20°C nas amostras de amido hidratado e amostras de amido + PHS

Ao nível do RMN de ^{13}C o efeito do tratamento térmico foi analisado em amostras de amido isolado e amido + 0,5 % PHS. O comportamento observado para as amostras de amido + 0,5% PHS foi semelhante ao observado para a amostra de amido isolado, o que seria de esperar dada a grande quantidade de amido em relação à quantidade de PHS na mistura. Assim, por uma questão de simplificação de resultados, nesta secção apenas é apresentada a discussão referente ao efeito do tratamento térmico nas amostras de amido isolado.

Com o aquecimento até 80°C da amostra de amido hidratada (50% m/m) e posterior arrefecimento até 20°C, observaram-se algumas alterações no espectro de ^{13}C -CP/MAS

registado depois do tratamento térmico, tal como se pode observar na Figura 6.17, para o amido da variedade SOR como exemplo. Comparando os espectros a e b da Figura 6.17 verifica-se que, após o tratamento térmico, a razão sinal/ruído diminuiu, o que reflecte alguma desorganização molecular. Logo após o arrefecimento da amostra, o amido encontra-se ainda no estado gel, caracterizado por ser um estado amorfo e desorganizado, não tendo tido tempo para passar para um estado mais organizado e cristalino.

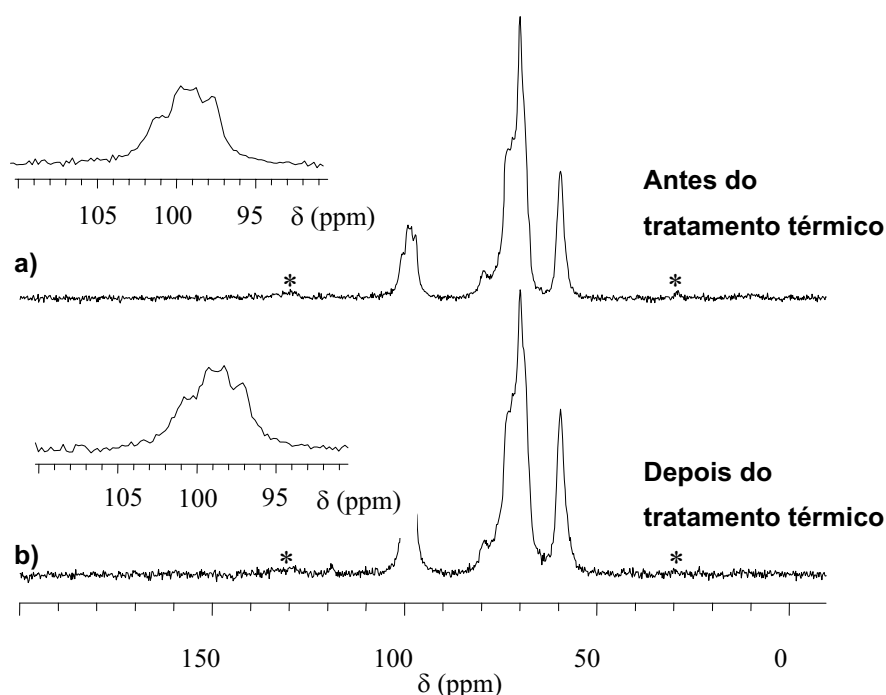


Figura 6.17 - Efeito do tratamento térmico nos espectros de ^{13}C -CP/MAS da amostra amido da variedade SOR, hidratada a 50% D_2O (m/m), SR= 6 kHz; a)- 20°C, antes do tratamento térmico, ns= 5032, LB=20 e b)- 20°C, depois do tratamento térmico, ns= 14172, LB=20; insertos apresentam a amplificação do sinal do carbono C1; *- bandas laterais de rotação

Como resultado da rede de ligações formada pelo gel de amido durante o arrefecimento, observou-se um aumento da largura de banda a meia altura dos sinais dos carbonos C6 (de 209 Hz para 239 Hz) e C2-C5 (de 545 Hz para 586 Hz). O sinal do carbono do C1 manteve a largura de banda inicial (455 Hz), e a conformação do sinal manteve-se praticamente inalterada, tal como é possível observar nos insertos da Figura 6.17.

O comportamento do amido aqui observado difere do comportamento da farinha com o tratamento térmico (§ III.3.3.1.3). Após o ciclo de aquecimento/arrefecimento, a razão sinal/ruído aumentou no espectro de ^{13}C -CP/MAS da farinha, indicando um aumento da rigidez da amostra em geral. A largura de banda a meia altura dos sinais dos carbonos C2-C5 manteve-se inalterada, a do carbono C6 aumentou e a do carbono C1 diminuiu. Após o tratamento térmico das amostras de farinha, observou-se ainda uma alteração da configuração do sinal do carbono C1. O diferente comportamento observado entre as amostras de farinha e de amido parece assim reflectir o efeito da presença dos outros componentes constituintes da farinha, tais como proteína, lípidos e PHS.

O comportamento observado para o amido da variedade AMA foi semelhante ao do amido SOR por efeito do tratamento térmico, observando-se apenas uma diferente configuração do sinal do carbono C1.

VI. 3.3.2. Caracterização por espectroscopia de ^1H -MAS

Através da espectroscopia de ^{13}C -CP/MAS foi possível seleccionar e analisar os carbonos mais rígidos das amostras de PHS e do amido. O estudo do comportamento das amostras ao nível do protão foi efectuado através da espectroscopia de RMN de ^1H -MAS que selecciona os protões nos ambientes mais móveis (Belton *et al.*, 1985, 1987, 1988a).

VI. 3.3.2.1. Caracterização das amostras de amido e PHS no estado seco

As amostras de amido e PHS foram primeiramente analisadas no estado seco (0% D_2O). Os espectros de ^1H -MAS destas amostras estão apresentados nas figuras 6.18 e 6.19, respectivamente. No sentido de detectar sinais diferenciadores dos dois polissacarídeos, para cada uma das amostras foram também adquiridos espectros com eco de spin, os quais são apresentados naquelas mesmas figuras.

As amostras de amido apresentaram espectros de ^1H -MAS (Figura 6.18 lado esquerdo) com perfis bastante semelhantes entre as variedades, com ambos os sinais centrados a 3,9 ppm, como resultado da contribuição de alguma água residual, e ambos com uma largura de banda de 3,4 kHz.

Os espectros adquiridos com eco de spin apresentaram-se mais resolvidos, revelando a presença de um maior número de sinais do que os espectros ^1H -MAS adquiridos sem eco de spin. No entanto, é possível observar ainda a presença de um componente largo, como resultado da anisotropia do campo magnético. O espectro da amostra de amido SOR apresentou uma maior quantidade de água, tal como revelado pelo sinal a 3,2 ppm.

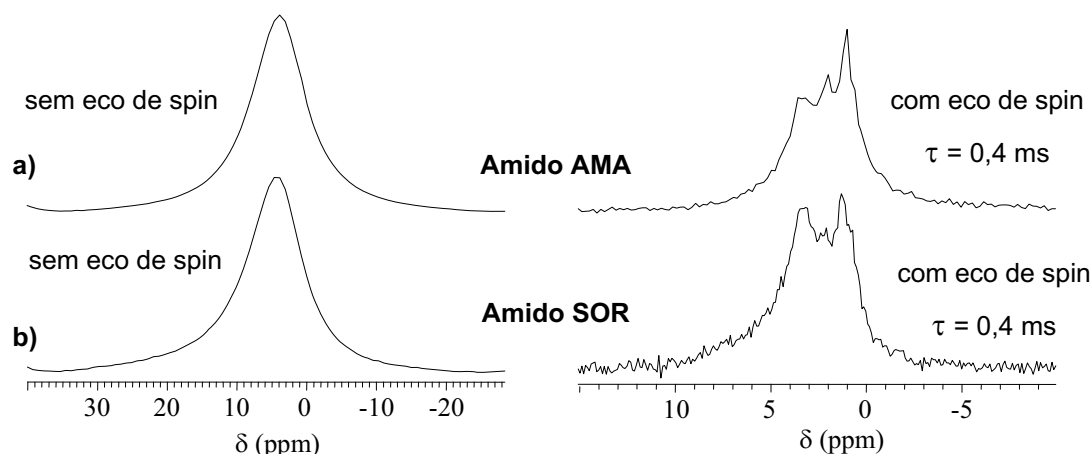


Figura 6.18 - Comparação entre os espectros de ^1H -MAS com (espectros da direita) e sem spin-echo (espectros da esquerda) para as duas variedades de amido, no estado seco, a 15 kHz de rotação; a)- amido Amazonas (AMA), ns= 72, spin-echo $\tau = 0,4$ ms, ns= 156; b) amido Sorraia (SOR) ns= 16, spin-echo $\tau = 0,4$ ms, ns= 198

As amostras de PHS das variedades AMA e SOR apresentaram espectros de ^1H -MAS (Figura 6.19 lado esquerdo) com um perfil igualmente semelhante entre as variedades, com os sinais centrados a 4,7 ppm e a 3,9 ppm para as amostras de PHS AMA e SOR, respectivamente. O espectro de ^1H -MAS das PHS da variedade SOR apresentou uma largura de banda (3,8 kHz) um pouco maior do que o espectro das PHS da variedade AMA (3,3 kHz).

Os espectros adquiridos com eco de spin apresentaram-se significativamente mais resolvidos do que os espectros ^1H e do que aqueles obtidos para o amido, nas mesmas

condições experimentais. Nos espectros das PHS, o componente largo desapareceu quase totalmente, como resultado da diminuição do efeito da anisotropia do campo magnético.

As PHS SOR apresentaram um espectro com eco de spin mais resolvido do que o respectivo espectro adquirido para as PHS AMA, o que poderá estar relacionado com uma maior mobilidade ou uma maior quantidade de água presente na amostra PHS SOR. A maior presença de água nesta amostra é também revelada pelo sinal a 3.4 ppm.

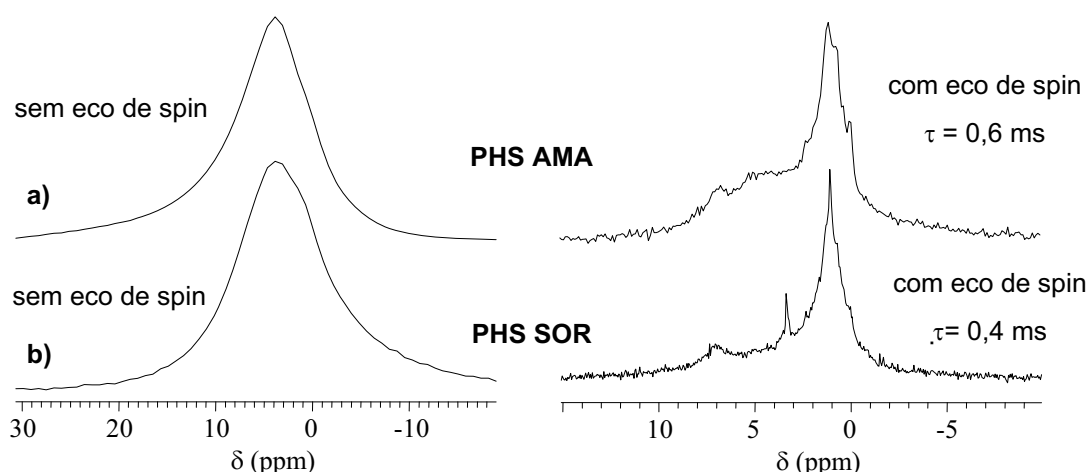


Figura 6.19 - Comparação entre os espectros de ^1H -MAS com (espectros da direita) e sem spin-echo (espectros da esquerda) para as duas variedades de PHS, no estado seco, a 15 kHz de rotação - a)- PHS AMA ns= 32, spin-echo $\tau = 0,6$ ms, ns= 477; b) PHS SOR ns= 24, spin-echo $\tau = 0,4$ ms, ns= 680

A partir dos espectros com eco de spin, verifica-se que as contribuições espectrais de ambas as frações de polissacarídeos sobrepõem-se no espectro de RMN de próton, o que dificulta a escolha de indicadores para a distinção dos dois componentes. Nos espectros das amostras de PHS verifica-se ainda a presença de contribuições a 6,7-7,1 ppm, ausentes nos espectros de amido, as quais são atribuídas à presença de proteína residual. Estes sinais, porém, dificilmente poderão ser tomados como indicadores da presença de PHS na farinha ou numa mistura de glúten+PHS já que se sobrepõem com as ressonâncias características de proteína.

VI. 3.3.2.2. Efeito da hidratação das amostras de amido

Para as amostras de amido das variedades AMA e SOR foi também estudado o efeito da hidratação nos espectros de ^1H -MAS. A hidratação dos sistemas de amido conduziu a alterações bastante significativas nos respectivos espectros de ^1H -MAS. A Figura 6.20 apresenta o espectro de amido hidratado a 50% (m/m) com D_2O , para a variedade SOR. Por uma questão de simplificação de resultados, apenas se apresenta o espectro do amido para uma variedade, uma vez que o efeito da hidratação foi idêntico para as variedades AMA e SOR, tendo ambas apresentado espectros com perfis bastante semelhantes.

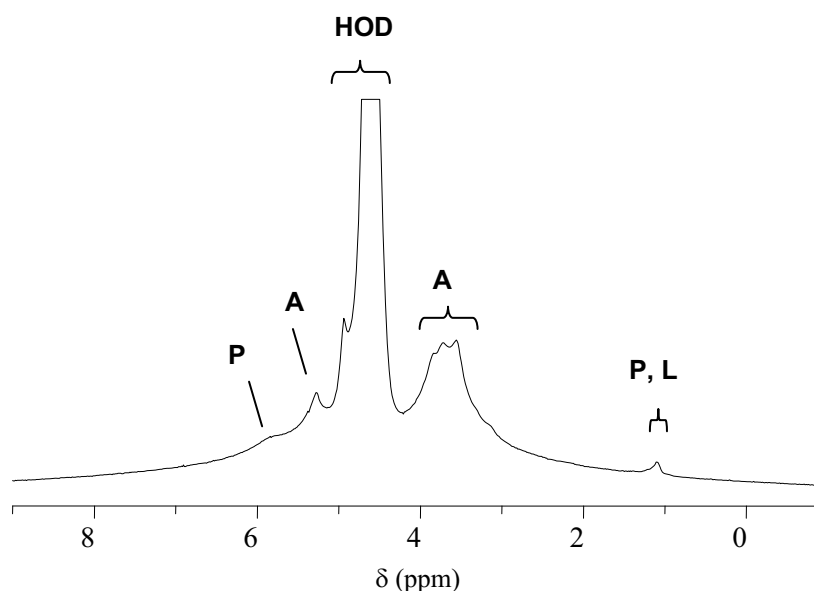


Figura 6.20 - Espectro ^1H /MAS de amido da variedade SOR hidratado (50% D_2O m/m), 10 kHz, ns=24; P- proteína, L- lípidos; A- amido; HOD- água

As respectivas atribuições dos picos estão apresentadas na Tabela 6.4 e foram baseadas em trabalhos publicados anteriormente (Wu *et al.*, 1992; Annison *et al.*, 1992; Vinkx *et al.*, 1995; Roels *et al.*, 1999; Delcour *et al.*, 1999; Roubroeks *et al.*, 2000), bem como no trabalho desenvolvido ao longo da presente tese.

O espectro de próton da amostra de amido hidratado apresenta um marcado aumento de resolução, apresentando um maior número de sinais, mais ou menos resolvidos. O aumento

de resolução do espectro com a hidratação surge como reflexo do aumento de mobilidade do sistema devido ao efeito de plastização da água, um efeito já anteriormente reportado por outros autores (Wu *et al.*, 1992). O espectro obtido é bastante semelhante ao espectro registado para o amido na farinha (§ III.3.3.2.3), apresentando, no entanto, uma menor contribuição de proteínas.

Tabela 6.4 - Atribuições dos sinais dos espectros de RMN de ^1H do estado sólido das amostras de PHS e amido hidratadas, baseadas em trabalhos publicados anteriormente (Wu *et al.*, 1992; Annison *et al.*, 1992; Vinkx *et al.*, 1995; Roels *et al.*, 1999; Delcour *et al.*, 1999; Roubroeks *et al.*, 2000)

δ (ppm)	Atribuição	
	Tipo de protão	Componente
1,1	CH_3-	Lípidos, proteína residual
3,1	$-\text{CH}-$	Amido (H2-H6)
3,6	$-\text{CH}-$	Amido (H2-H6)
3,8	$-\text{CH}$	Amido (H2-H6)
4,6	HOD	Água
5,3	$-\text{CHO}$	Amido (H1), Arabinoxilanas (H1)
6,1	$-\text{NH}_2$ aromáticos	Proteína residual

VI. 3.3.2.3. Efeito da adição de PHS ao amido

O efeito da adição de PHS ao amido foi apenas estudado para misturas da variedade SOR. A Figura 6.21 apresenta os espectros de RMN de ^1H -MAS do amido isolado (0% PHS) e da mistura amido + 0,5% PHS (m/m) da variedade SOR.

O espectro de protão da mistura amido + 0,5%PHS (Figura 6.21b) apresenta um perfil igualmente bastante complexo. O espectro da mistura amido + 0,5%PHS é também dominado pelo pico mais intenso a 4,6 ppm, atribuído à água. Dada a grande quantidade de amido relativamente à quantidade de PHS no sistema misto, os picos exibidos pelo respectivo espectro devem-se essencialmente à contribuição do amido, cujo comportamento poderá ser afectado pela presença de PHS. No espectro da Figura 6.21b,

observa-se uma ligeira alteração da configuração da banda a 3,1-3,8 ppm o que pode ter surgido como consequência indirecta da adição de PHS ao sistema. O ombro a 3,1 ppm desdobrou-se em dois sinais a 3,1 e 3,3 ppm. O sinal a 1,1 aparece mais resolvido indicando um aumento da mobilidade dos prótons metílicos. A presença de PHS parece ainda ter afectado a contribuição das proteínas residuais, uma vez que os sinais derivados da contribuição destas desapareceram. Este facto poderá estar relacionado com um maior aumento de mobilidade da matriz de hidratos de carbono devido à introdução de PHS (tal como confirmado pelos tempos de relaxação) em relação à proteína, pelo que os sinais indicadores deste último componente deixaram de ser detectáveis.

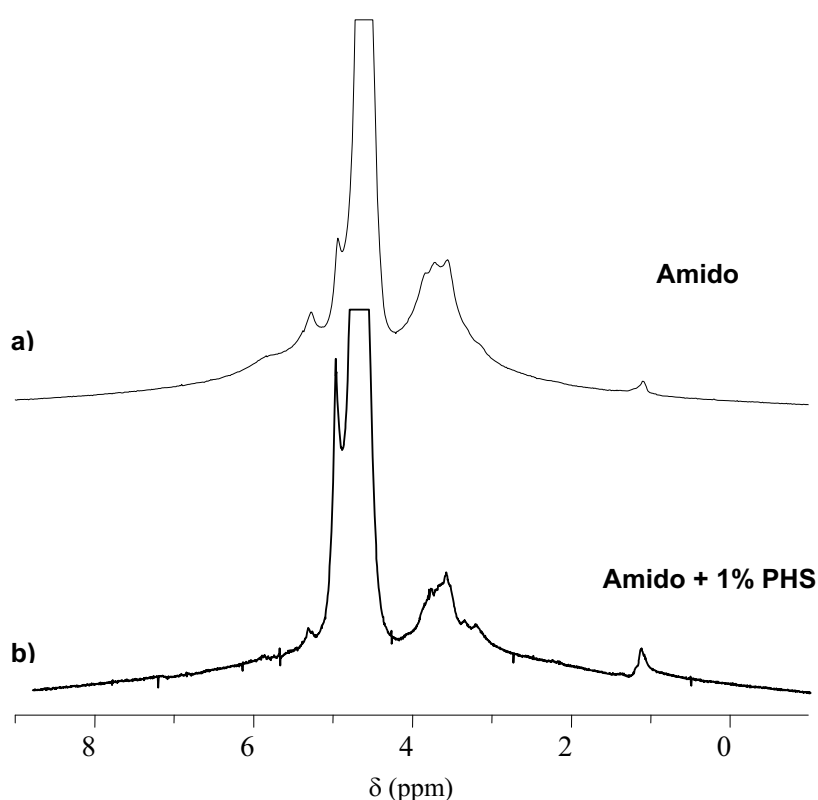


Figura 6.21 - Efeito da adição de PHS nos espectros de ^1H /MAS do amido; amostras da variedade SOR hidratadas 50% D_2O (m/m); SR=10 kHz; a)- amido, ns=24; b) amido + 0,5% PHS, ns=32.

O efeito da adição de PHS ao amido foi também analisado através da medição dos tempos de relaxação longitudinal ($T_{1\text{H}}$) e de relaxação transversal ($T_{2\text{H}}$). As Tabelas 6.5 e 6.6 apresentam, respectivamente, os valores de $T_{1\text{H}}$ e $T_{2\text{H}}$ registados para as amostras de amido

e amido + 0,5% PHS da variedade SOR, hidratadas a 50% D₂O (m/m), à temperatura ambiente (20°C, antes do tratamento térmico).

Analisando a amostra de amido, verifica-se que os valores de T_{1H} (Tabela 6.5) foram semelhantes entre a maioria dos picos visíveis, tendo em conta o significativo erro experimental associado, indicando uma difusão de spin eficiente. A água apresentou um T_{1H} superior ao dos restantes componentes o que indica alguma separação desta relativamente ao amido. O maior valor apresentado pela água indica que esta se encontra mais mobilizada do que os outros componentes, tal como é confirmado pelos valores de T_{2H} mais longos (Tabela 6.6). Este resultado sugere que os valores de T_{1H} da água se encontram no lado da curva do T_{1H} dos tempos de correlação mais curtos (§ I.2.2.3.1), pelo que a água se deverá encontrar maioritariamente do seu estado livre.

Tabela 6.5 - Valores dos tempos de relaxação longitudinal - T_{1H} - para as amostras de amido e amido + 0,5% PHS da variedade Sorraia, hidratadas a 50% D₂O (m/m), à temperatura ambiente (20°C antes do aquecimento)

δ (ppm)	Atribuição	T _{1H} (s)	
		Amido	Amido + 0,5% PHS
1.1	Lípidos, proteína residual	2,28 ± 0,12	3,12 ± 0,07
3.2	Amido (H2-H6)	2,14 ± 0,18	1,73 ± 0,13
3.6	Amido (H2-H6)	1,87 ± 0,19	1,18 ± 0,05
3.8	Amido (H2-H6)	1,82 ± 0,14	1,45 ± 0,09
4.6	Água	2,61 ± 0,24	2,97 ± 0,74
5.3	Amido (H1), Arabinosilanas (H1)	2,02 ± 0,15	1,11 ± 0,05
6.1	Proteína residual	2,37 ± 0,56	n.d.

n.d. - não detectável

A Tabela 6.6 mostra que todos os componentes da amostra de amido apresentaram dois valores de T_{2H} , o que indica a existência de dois ambientes com mobilidades distintas na amostra. A água apresentou-se como o componente mais móvel, apresentando o valor de T_{2B} mais elevado (seguidamente aos lípidos) e uma elevada percentagem da população de prótons móveis. Os valores de T_{2B} apresentaram alguma variação entre os sinais derivados do amido, indicando a existência de diferentes magnitudes de mobilidade dentro da matriz do amido.

Tabela 6.6 - Valores dos tempos de relaxação transversal - T_{2H} - para as amostras de amido e amido + 0,5% PHS da variedade Sorraia, hidratadas a 50% D_2O (m/m), à temperatura ambiente (20°C antes do aquecimento)

δ (ppm)	Atribuição	Amido			Amido + 0,5% PHS		
		T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% prótons móveis (T_{2B})	T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% prótons móveis (T_{2B})
1,1	Lípidos, proteína residual	$0,090 \pm 0,022$	$12,7 \pm 1,4$	43	$0,067 \pm 0,020$	$13,9 \pm 1,3$	45
3,2	Amido (H2-H6)	$0,138 \pm 0,014$	$2,55 \pm 0,52$	50	$0,158 \pm 0,017$	$7,79 \pm 1,18$	24
3,6	Amido (H2-H6)	$0,284 \pm 0,024$	$6,03 \pm 0,53$	37	$0,138 \pm 0,042$	$10,9 \pm 1,2$	50
3,8	Amido (H2-H6)	$0,203 \pm 0,340$	$3,18 \pm 0,39$	52	$0,132 \pm 0,051$	$11,0 \pm 1,5$	54
4,6	Água	$0,213 \pm 0,033$	$9,32 \pm 0,12$	84	$0,805 \pm 0,331$	$12,3 \pm 0,6$	85
5,3	Amido (H1), Arabinoxilanas (H1)	$0,178 \pm 0,040$	$6,02 \pm 1,10$	38	$0,263 \pm 0,100$	$17,4 \pm 6,6$	30
6,1	Proteína residual	$0,260 \pm 0,040$	-	-	-	-	-

A adição de 0,5% de PHS à amostra de amido conduziu à diminuição dos valores de T_{1H} dos sinais derivados do amido (3,2-3,8 ppm e 5,3 ppm) e aumento do valor de T_{1H} da água, o que foi acompanhado pelo aumento dos respectivos valores de T_{2H} . Este resultado sugere que a adição de PHS contribuiu para um aumento da mobilidade quer do amido, quer da água, contribuindo assim para a mobilização de todo o sistema.

A adição de PHS contribuiu ainda para uma maior aproximação dos valores de T_{1H} entre os vários componentes do amido, o que indica uma difusão de spin mais eficiente na matriz de hidratos de carbono, observando-se ainda um afastamento da água em relação ao amido. No entanto, todos componentes apresentaram valores de T_{2H} da mesma ordem de grandeza (dado o erro experimental associado) o que sugere que, após a adição de PHS, os vários componentes apresentaram mobilidades de magnitude comparável.

VI. 3.3.2.4. Efeito do tratamento térmico

O comportamento das amostras de amido e amido + 0,5% PHS da variedade SOR durante o tratamento térmico foi seguido através da aquisição de espectros de RMN de 1H /MAS a várias temperaturas, na gama 20-80-20°C. O efeito do tratamento térmico foi também analisado através dos tempos de relaxação T_{1H} e T_{2H} , registados às temperaturas extremas.

A Figura 6.22 apresenta os espectros de 1H -MAS para as amostras de amido e amido + 0,5% PHS adquiridos às temperaturas de 20°C (antes do aquecimento), 60°C, 80°C e novamente a 20°C (depois do tratamento térmico).

De um modo geral, o aquecimento das amostras promoveu um aumento de resolução para todos os picos, o que indica que o aumento da temperatura conduziu a um aumento generalizado da mobilidade para ambos os sistemas. O aumento de resolução, e portanto o aumento da mobilidade, resulta da diminuição dos tempos de correlação e do aumento dos tempos de relaxação T_{2H} , tal como será referido posteriormente.

A elevação da temperatura conduziu a um efeito semelhante para ambas as amostras de amido e amido+0,5% PHS. Durante o aquecimento das amostras, salienta-se o comportamento observado para os sinais do amido a 3,6-3,8 ppm (H2-H6) e a 5.3 ppm (H1).

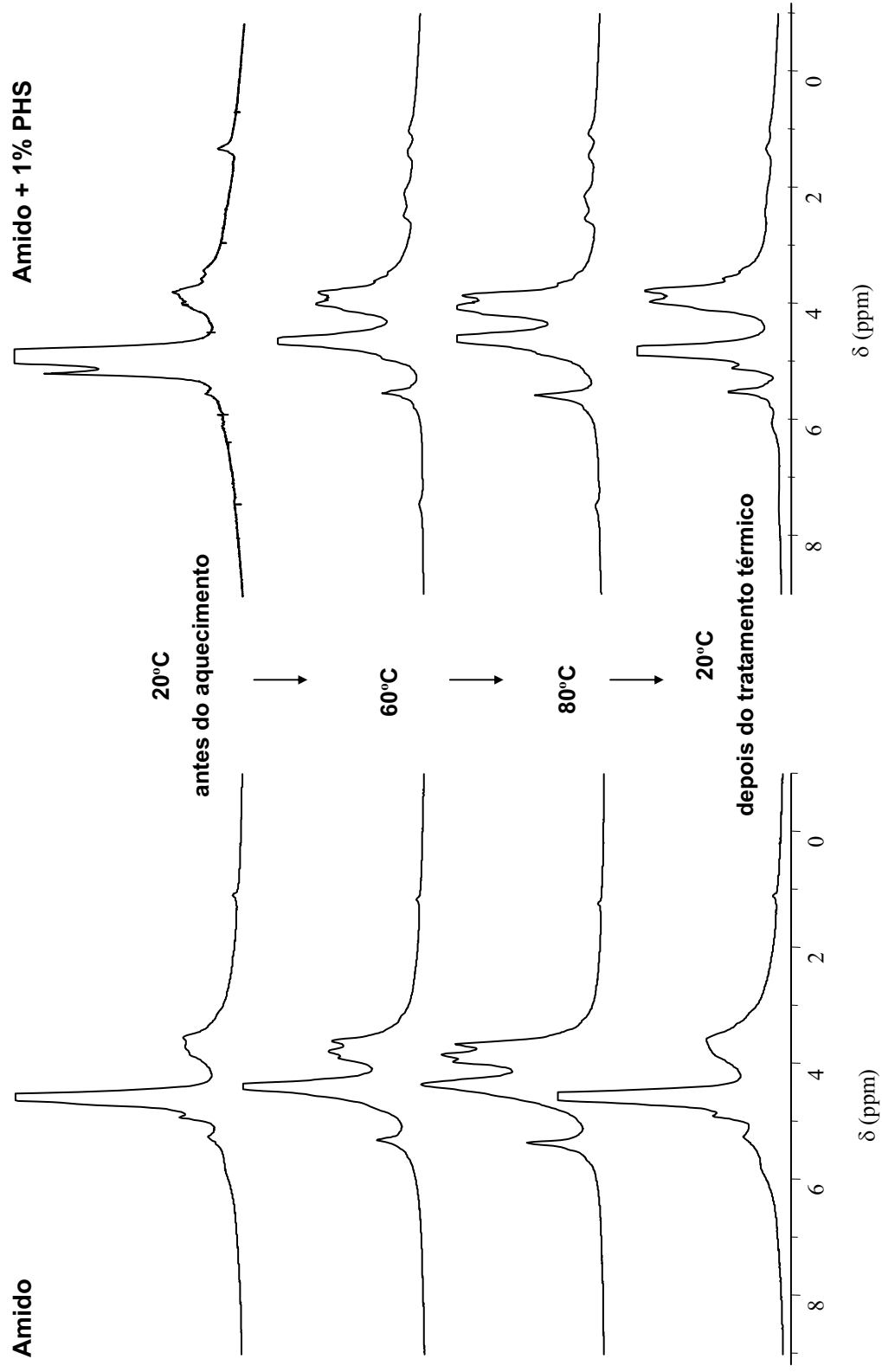


Figura 6.22 - Comportamento do sistema amido + 0,5% (m/m) de pentosanas hidrossolúveis (50% D₂O m/m) ao longo do ciclo de aquecimento (20-80°C) e arrefecimento (80-20°C); todos os espectros adquiridos a 10kHz. Espectros de amido, ns= 24; espectros de amido+0,5%PHS, ns= 32.

Com a subida da temperatura, a banda dos sinais do amido a mais baixo ppm (3,6-3,8 ppm) aumentou bastante de intensidade, aparecendo agora agregada à banda da água, como resultado do alargamento desta última.

Os espectros a 80°C mostram que os sinais dos prótons H2-H6 se encontram quase à mesma intensidade que o sinal da água, revelando o marcado acréscimo de mobilidade destes prótons. O sinal do amido a 5.3 ppm, também aumentou bastante de resolução e de intensidade, por efeito do acréscimo de mobilidade. O aumento de mobilidade dos prótons do amido está relacionado com o processo de gelatinização do amido, atrás já referido, não sendo aqui evidente o efeito das PHS.

No caso da amostra de amido + 0,5%PHS, os picos das ressonâncias da região alifática (0-3 ppm) aumentaram significativamente de intensidade e de resolução por efeito do aumento da temperatura. Estes sinais, ausentes nos espectros de amido, deverão ser devidos às proteínas residuais presentes na amostra de PHS, já que as amostras de PHS contabilizaram na sua composição cerca de 20-26 % de proteínas (§ II.3.3.3). Os espectros desta amostra mostraram ainda o aparecimento de sinais na região de 6-8 ppm, derivados da ressonância dos prótons -NH e H-aromáticos, provenientes igualmente da contribuição da fracção proteica presente nas amostras de PHS.

Com o arrefecimento (20°C após tratamento), para ambas as amostras, observa-se uma diminuição generalizada da intensidade de todos os sinais, relativamente aos espectros adquiridos a 80°C. Comparativamente aos espectros registados antes do aquecimento, verifica-se que o amido mostrou uma tendência para recuperar o perfil inicial. O espectro da amostra de amido + 0,5% PHS, interessantemente, apresentou um comportamento totalmente distinto do da amostra de amido: apesar de alguma diminuição de intensidade dos sinais em geral, os sinais derivados do amido apresentaram ainda uma intensidade bastante evidente, sendo ainda possível distinguir alguns sinais derivados da proteína. A elevada intensidade verificada para os sinais do amido é uma indicação de que, na amostra de amido + 0,5 %PHS, os prótons H2-H6 e H1 apresentaram ainda uma grande mobilidade, devido ao efeito da presença das PHS.

Ao longo do ciclo de aquecimento/arrefecimento, o pico da água variou de posição ao longo do desvio químico, tal como já era esperado (Wishart *et al.*, 1995). Durante o

aquecimento, o pico da água deslocou-se para mais baixo desvio químico, tendo depois recuperado a sua posição inicial após o arrefecimento, o que indica uma tendência para a reversibilidade do comportamento da água ao longo do ciclo de aquecimento/arrefecimento, o que é confirmado pelos valores de T_{1H} e T_{2H} registados para a água (ver mais à frente).

O comportamento das amostras de amido e amido+PHS ao longo do tratamento térmico foi igualmente seguido pela dinâmica de relaxação através dos tempos de relaxação T_{1H} e T_{2H} . Nas Tabelas 6.7 e 6.9 encontram-se os valores de T_{1H} registados para as amostras de amido e amido + 0,5% PHS da variedade SOR, hidratadas a 50% D_2O (m/m). Para estas mesmas amostras são igualmente apresentados os valores de T_{2H} nas Tabelas 6.8 e 6.10 respectivamente. Os valores registados à temperatura ambiente (20°C, antes do aquecimento) são novamente apresentados de modo a facilitar a comparação dos resultados.

Com o aquecimento até 80°C, verifica-se uma diminuição generalizada dos valores de T_{1H} na amostra de amido (Tabela 6.7), sugerindo um aumento da mobilidade por efeito da subida da temperatura. No caso da água, a diminuição dos valores de T_{1H} indica uma maior imobilização deste componente, o que é confirmado pela diminuição dos valores de T_{2H} (discutido mais à frente).

Com o arrefecimento da amostra de amido, observa-se uma ligeira subida dos valores de T_{1H} , indicando uma diminuição da mobilidade relativamente ao estado da amostra a 80°C. Porém, comparativamente aos valores registados antes do aquecimento, verifica-se que os valores de T_{1H} registados depois do tratamento térmico aproximaram-se dos valores iniciais, tendo em conta o erro associado, sugerindo uma tendência para a reversibilidade do comportamento. Os valores de T_{1H} são também bastante semelhantes entre os vários componentes, o que indica uma eficiente difusão de spin. A água deixou de estar separada do amido, indicando uma boa hidratação e uma distribuição homogênea da água em toda a amostra.

Relativamente ao T_{2H} , verifica-se que o amido apresentou um comportamento bi-exponencial dos valores de T_{2H} (Tabela 6.8) ao longo do tratamento térmico, indicando a existência de dois ambientes com mobilidades diferentes na amostra.

Tabela 6.7 - Variação dos tempos de relaxação longitudinal - T_{1H} (s) - para a amostra de amido da variedade Sorraia, hidratada a 50% D₂O (m/m), ao longo do tratamento térmico 20-80-20°C

δ (ppm)	Componente	Temperaturas		
		20°C antes do tratamento térmico	80°C	20°C depois do tratamento térmico
1.1	Lípidos, proteína residual	2,28 ± 0,12	1,97 ± 0,18	1,84 ± 0,03
3.2	Amido (H2-H6)	2,14 ± 0,18	-	1,76 ± 0,07
3.6	Amido (H2-H6)	1,87 ± 0,19	1,50 ± 0,03	1,75 ± 0,05
3.8	Amido (H2-H6)	1,82 ± 0,14	1,34 ± 0,05	1,78 ± 0,05
4.6	Água	2,61 ± 0,24	1,81 ± 0,01	1,85 ± 0,01
5.3	Amido (H1), Arabinoxilanas (H1)	2,02 ± 0,15	1,50 ± 0,03	1,93 ± 0,05
6.1	Proteína residual	2,37 ± 0,56	n.d.	1,99 ± 0,11

n.d. - não detectável

Os valores de T_{2H} registados para o amido mostram um aumento de mobilidade para a maioria dos componentes por aquecimento da amostra até 80°C, observando-se um significativo aumento da percentagem de prótons móveis, bem como a subida dos valores de T_{2H} para a maioria dos componentes. A água, no entanto, apesar de apresentar a maior percentagem de prótons móveis, apresenta uma diminuição do valor de T_{2H} , o que indica que esta se torna mais imobilizada, provavelmente devido ao processo de gelatinização do amido, encontrando-se aprisionada na rede de gel do amido.

Com o arrefecimento, observa-se uma diminuição dos valores de T_{2H} apenas para o sinal do amido a 5,3 ppm e o sinal da proteína a 6,1 ppm. Para todos os valores observa-se uma diminuição da percentagem de prótons móveis, o que indica uma diminuição da mobilidade.

Tabela 6.8 - Variação dos tempos de relaxação transversal - T_{2H} - para a amostra de amido da variedade Sorraia, hidratada a 50% D_2O (m/m), ao longo do tratamento térmico 20-80-20°C

δ (ppm)	Componente	20°C			80°C			20°C		
		antes do aquecimento						depois do tratamento térmico		
		T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% prótons móveis (T_{2B})	T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% prótons móveis (T_{2B})	T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% prótons móveis (T_{2B})
1,1	CH_3 -	$0,090 \pm 0,022$	$12,7 \pm 1,4$	43	$0,180 \pm 0,073$	$11,6 \pm 0,8$	73	$0,045 \pm 0,022$	$21,2 \pm 2,1$	50
3,2	$-CH_2$ -	$0,138 \pm 0,014$	$2,55 \pm 0,52$	50	-	-	-	-	-	-
3,6	$-CH_2$ -	$0,284 \pm 0,024$	$6,03 \pm 0,53$	37	$0,205 \pm 0,052$	$5,98 \pm 0,31$	74	$0,219 \pm 0,017$	$5,93 \pm 0,34$	45
3,8	$-CH$	$0,203 \pm 0,340$	$3,18 \pm 0,39$	52	$0,187 \pm 0,050$	$5,27 \pm 0,25$	77	$0,261 \pm 0,033$	$5,03 \pm 0,55$	38
4,6	HOD	$0,213 \pm 0,033$	$9,32 \pm 0,12$	84	$0,093 \pm 0,078$	$1,96 \pm 0,12$	88	$0,120 \pm 0,088$	$10,4 \pm 0,7$	81
5,3	$-CHO$	$0,178 \pm 0,040$	$6,02 \pm 1,10$	38	$0,778 \pm 0,255$	$13,5 \pm 1,3$	73	$0,182 \pm 0,050$	$5,33 \pm 0,98$	40
6,1	$-NH_2$ aromáticos	$0,260 \pm 0,040$	-	-	$0,177 \pm 0,051$	$2,97 \pm 0,51$	44	$0,149 \pm 0,035$	$3,88 \pm 1,69$	25

n.d. - não detectável

Os valores de T_{2H} observados após o tratamento térmico são semelhantes aos registrados antes do aquecimento, o que indica uma reversibilidade do comportamento. A água continua como o componente mais móvel, apresentando um valor de T_{2H} mais elevado do que o amido, e mantendo praticamente a mesma população de prótons móveis. O sinal derivado da contribuição dos lípidos apresenta ainda uma elevada mobilidade, o que é confirmado pelo elevado valor de T_{2H} .

O comportamento do amido aqui observado difere do comportamento do amido na farinha, o qual, durante o aquecimento a 80°C, apresentou uma diminuição dos valores de T_{1H} e valores de T_{2H} mais curtos, indicando uma diminuição da mobilidade. Este diferente comportamento verificado durante o aquecimento sugere, mais uma vez, que o comportamento do amido é influenciado pela presença de outros componentes. Após o arrefecimento, no entanto, os valores de T_{1H} e T_{2H} registrados para o amido na farinha apontaram para um aumento da imobilização, tal como verificado para a amostra de amido isolado.

A adição de 0,5% de PHS ao amido conduziu a algumas alterações no comportamento durante o tratamento térmico, ao nível do T_{1H} (Tabela 6.9). Com o aquecimento da amostra de amido + 0,5%PHS até 80°C, verificou-se uma ligeira subida dos valores de T_{1H} , contrariamente ao observado para o amido, sobretudo para os sinais derivados do amido a 3,6 ppm e a 5,3 ppm, não se verificando qualquer alteração significativa para o sinal a 3,8 ppm. A subida dos valores de T_{1H} destes componentes indica um acréscimo de mobilidade devido à adição de PHS, o que é confirmado pelo comportamento do T_{2H} . A água registou uma descida do valor de T_{1H} o que, de acordo com a variação dos valores de T_{2H} , sugere que a água se terá tornado mais imobilizada.

Após o arrefecimento, os valores de T_{1H} foram mais elevados relativamente aos valores registrados antes do tratamento térmico, o que indica que o sistema se encontra ainda bastante móvel. No entanto, relativamente ao valor registado antes do tratamento térmico, a água apresentou um valor de T_{1H} mais baixo, indicando que ela se encontra mais imobilizada. À excepção do sinal do amido a 3,8 ppm e do sinal derivado da contribuição dos lípidos (1,1 ppm) todos os restantes sinais apresentaram valores de T_{1H} semelhantes entre si, revelando uma eficiente difusão de spin. Os valores de T_{1H} apresentados pela

amostra de amido+0,5%PHS após o tratamento térmico são da mesma ordem de grandeza dos respectivos valores observados para o amido.

Tabela 6.9 - Variação dos tempos de relaxação longitudinal - T_{1H} - para a amostra de amido + 0,5% (m/m) PHS da variedade Sorraia, hidratada a 50% D_2O (m/m), ao longo do tratamento térmico 20-80-20°C

δ ppm	Componente	Temperaturas		
		20°C antes do aquecimento	80°C	20°C depois do tratamento térmico
1.1	Lípidos, proteína residual	$3,12 \pm 0,07$	$2,41 \pm 0,14$	$2,10 \pm 0,06$
3.2	Amido (H2-H6)	$1,73 \pm 0,13$	-	$1,88 \pm 0,07$
3.6	Amido (H2-H6)	$1,18 \pm 0,05$	$1,51 \pm 0,03$	$1,78 \pm 0,06$
3.8	Amido (H2-H6)	$1,45 \pm 0,09$	$1,40 \pm 0,03$	$1,58 \pm 0,06$
4.6	Água	$2,97 \pm 0,74$	$1,99 \pm 0,03$	$1,82 \pm 0,01$
5.3	Amido (H1), Arabinoxilanas (H1)	$1,11 \pm 0,05$	$1,33 \pm 0,07$	$1,76 \pm 0,04$
6.1	Proteína residual	n.d.	$2,70 \pm 0,44$	$1,84 \pm 0,05$

n.d. - não detectável

Os valores de T_{2H} da amostra de amido + 0,5% PHS (Tabela 6.10) apresentaram também um comportamento diferente ao longo do tratamento térmico, relativamente à amostra de amido. Com o aquecimento até 80°C, verifica-se que os valores de T_{2H} não variaram significativamente, dada a gama de incerteza associada aos valores de T_{2H} registados antes do aquecimento. Porém, a percentagem de prótons móveis aumentou, o que revela um acréscimo de mobilidade na amostra em geral. O valor de T_{2H} da água diminuiu, bem como

Tabela 6.10 - Variação dos tempos de relaxação transversal - T_{2H} - para a amostra de amido + 0,5% (m/m) PHS da variedade Sorraia, hidratada a 50% D₂O (m/m), ao longo do tratamento térmico 20-80-20°C

δ (ppm)	Componente	20°C			80°C			20°C		
		antes do aquecimento						depois do tratamento térmico		
		T2A / ms	T2B /ms	% protões móveis (T2B)	T2A / ms	T2B /ms	% protões móveis (T2B)	T2A / ms	T2B /ms	% protões móveis (T2B)
1,1	Lípidos, proteína residual	0,067 ± 0,020	13,9 ± 1,3	45	-	-	-	-	-	-
3,3	Amido (H2-H6)	0,158 ± 0,017	7,79 ± 1,18	24	-	-	-	-	-	-
3,6	Amido (H2-H6)	0,138 ± 0,042	10,9 ± 1,2	50	0,369 ± 0,079	9,45 ± 0,93	56	0,211 ± 0,054	5,84 ± 0,30	72
3,8	Amido (H2-H6)	0,132 ± 0,051	11,0 ± 1,5	54	0,231 ± 0,171	8,56 ± 0,46	88	0,88 ± 0,23	10,4 ± 2,4	50
4,8	Água	0,805 ± 0,331	12,3 ± 0,6	85	0,030 ± 0,017	7,21 ± 0,57	78	1,99 ± 1,74	8,04 ± 0,39	93
5,3	Amido (H1), Arabinoxilanas (H1)	0,263 ± 0,100	17,4 ± 6,6	30	0,917 ± 0,227	21,9 ± 1,4	73	0,271 ± 0,355	7,42 ± 0,94	36
6,1	Proteína residual	n.d.	-	-		-	-	-	-	-

a respectiva percentagem de prótons móveis, o que indica que esta se tornou mais imobilizada no sistema. Porém, a descida dos valores de T_{2H} da água observada para a amostra com PHS não foi tão marcada como a observada para a amostra de amido.

Com o arrefecimento, observa-se uma diminuição dos valores de T_{2H} relativamente aos valores registados antes do tratamento térmico, à semelhança do observado para o amido, sobretudo para os sinais derivados dos hidratos de carbono a 3,6 ppm e 5,3 ppm, bem como para a água (4,6 ppm). Apesar da descida do valor de T_{2H} observada para a água, esta apresenta uma elevada percentagem de prótons móveis, e uma mobilidade de magnitude comparável à dos hidratos de carbono. Na amostra de amido isolado, a água apresentou um valor de T_{2H} mais elevado, com uma menor população de prótons móveis. Nesta amostra, a água e os hidratos de carbono apresentam mobilidades de diferente magnitude, observando-se uma menor mobilidade para os hidratos de carbono (valores de T_{2H} mais baixos)

VI. 4. Conclusões

Neste capítulo, caracterizou-se o processo de gelificação do amido extraído das duas variedades de trigo *Sorraia* e *Amazonas* e estudou-se o efeito de duas amostras de PHS extraídas dessas mesmas variedades, sobre as propriedades reológicas e espectroscópicas do amido.

As duas variedades de amido apresentaram propriedades de gelificação distintas: amido da variedade *Amazonas* apresentou valores de temperatura de gelatinização e de G' máximo superiores aos do amido da variedade *Sorraia*, o que estará relacionado com a maior percentagem de amido danificado e maior população de grânulos de amido tipo B presentes no amido *Amazonas*. A apresentação de temperaturas de gelatinização mais elevadas para o amido da variedade *Amazonas* foi confirmada pelos resultados de DSC. Após tratamento térmico, os amidos de ambas as variedades apresentaram módulos viscoelásticos bastante semelhantes, apresentando um comportamento reológico igualmente bastante semelhante.

A quantidade de solvente utilizado para a hidratação exerceu uma grande influência nas propriedades de gelificação do amido. Em condições de excesso de hidratação (80% m/m),

as temperaturas de gelatinização aumentaram ligeiramente, e os módulos viscoelásticos foram bastante mais baixos como resultado da formação de géis de amido bastante mais frágeis.

A partir da espectroscopia de RMN não foram encontradas diferenças no comportamento ao nível molecular entre os amidos de ambas as variedades.

Do ponto de vista reológico, o efeito das PHS na formação dos géis de amido variou consoante as características das PHS e do grau de hidratação, factores que poderão ter uma importante implicação tecnológica produtos/processos que envolvam a farinha de trigo. De um modo geral, a presença de PHS conduziu a um aumento das temperaturas de gelatinização e ao aumento do carácter viscoso dos géis formados. O efeito mais marcante da presença de PHS foi observado para o nível de hidratação mais elevado (80% m/m) e para as PHS da variedade SOR, caracterizadas por uma viscosidade intrínseca mais elevada, o que está de acordo com o observado nos ensaios de DSC. As alterações ao nível da reologia durante o arrefecimento e os resultados de DSC com o tempo de armazenamento observados para as amostras de amido+PHS, e o efeito mais pronunciado observado em condições de excesso de hidratação, sugerem que as moléculas de PHS, para além de competirem com o amido pela água, podem também interagir com a amilose e a amilopectina, prevenindo a reorganização destas macromoléculas na rede do gel de amido, retardando assim o processo de retrogradação do amido. Após a redução do teor em proteínas, as amostras de PHS de ambas as variedades apresentaram um comportamento bastante semelhante, o que sugere que as proteínas residuais presentes nas amostras de PHS podem influenciar o comportamento reológico dos sistemas amido-PHS.

Através da espectroscopia de RMN de ^1H foi possível verificar que a adição de PHS ao amido conduziu a um aumento da mobilidade do sistema em geral, tal como confirmado pela diminuição dos valores de T_{1H} e aumento dos valores de T_{2H} . Os valores de T_{1H} e T_{2H} registados após o tratamento térmico mostram que após o arrefecimento os sistemas de amido+PHS apresentam ainda uma grande mobilidade, o que poderá estar relacionado com o maior carácter viscoso observado para os géis de amido+PHS formados após o tratamento térmico. Após o arrefecimento, a água e o amido apresentaram mobilidade de magnitude comparável o que sugere que as macromoléculas constituintes do amido se

apresentam ainda suficientemente hidratadas, não tendo ainda iniciado o processo de retrogradação.

Os resultados obtidos ao nível da reologia e ao nível da espectroscopia mostraram assim ser concordantes. O aumento do carácter viscoso dos sistemas constituídos por amido e PHS observado ao nível da reologia traduziu-se no aumento da mobilidade observada ao nível do RMN. A manutenção de um sistema hidratado ao longo do tratamento térmico e o retardamento da ocorrência da retrogradação foi observada quer ao nível da reologia quer ao nível da espectroscopia de RMN.

CAPÍTULO VII

CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA E ESPECTROSCÓPICA DE SISTEMAS RECONSTITUÍDOS



VII. 1. Introdução

Numa massa de pão, os vários constituintes da farinha encontram-se em contacto muito próximo uns com os outros. As proteínas e o amido, os principais constituintes das farinhas de trigo, interactuam entre si (Dreese *et al.*, 1988a; Petrofsky e Hoseney, 1995; Guerrieri *et al.*, 1997; Miller e Hoseney, 1999), e esta interacção reveste-se de grande importância para o desenvolvimento de uma massa com boas propriedades reológicas e de panificação. Por exemplo, foi demonstrado em trabalhos prévios, que amidos provenientes de diferentes variedades de trigo, quando misturados com uma mesma amostra de glúten, levam a diferentes propriedades reológicas das misturas assim obtidas (Petrofsky e Hoseney, 1995; Miller e Hoseney, 1999).

A interacção entre o amido e o glúten tem também sido evidenciada através de estudos enzimáticos. Holm *et al.* (1985) e Björck *et al.* (1986) analisaram a disponibilidade do amido para enzimas amilolíticas em amostras de farinha de trigo, antes e depois da incubação com proteases, e registaram um acréscimo da actividade amilolítica após a digestão da farinha com pepsinas. Champenois *et al.* (1998b) analisaram a actividade de α -amilases em sistemas constituídos por amido e glúten, com diferentes concentrações de glúten, tendo reportado a diminuição da degradação amilolítica com o aumento da concentração de glúten.

A presença de glúten parece afectar a retrogradação de géis de amido. Forcinti e LeGrys (1989) verificaram uma diminuição da taxa de retrogradação do amido, em géis constituídos por amido e glúten. Uma maior quantidade de glúten resultou na formação de géis menos rígidos e mais susceptíveis à ruptura por aplicação de uma deformação. Estes autores sugeriram que o efeito do glúten consistiu na diminuição da quantidade de água disponível no sistema, bem como na diluição da capacidade estruturante do amido.

A influência do glúten nas propriedades viscoelásticas do amido foi já referida anteriormente por outros autores (Lindhal e Eliasson, 1986; Champenois *et al.*, 1998a). Lindhal e Eliasson (1986) mediram parâmetros reológicos de géis de amido e misturas amido com glúten, tendo mostrado um aumento do módulo de conservação dos géis devido à presença de glúten. Estes autores referiram ainda que a interacção amido-glúten é mediada por proteínas adsorvidas à superfície dos grânulos de amido, um efeito apenas presente em sistemas constituídos por amido de trigo ou de centeio, e não em sistemas

constituídos por amido de milho, cevada, tritcale ou de batata. Champenois *et al.* (1998a) estudaram o efeito de diferentes razões glúten/amido em pastas/géis constituídas por glúten e amido, tendo encontrado valores de G' mais elevados e maiores temperaturas de gelatinização para amostras com maior proporção de glúten.

As interacções entre o amido e o glúten podem ser afectadas pela presença de outros componentes, tais como açúcares, sais, adição de cisteínas, e emulsionantes. A adição de qualquer componente que afecte as propriedades de gelatinização do amido, poderá alterar a dinâmica de interacções entre o amido e o glúten.

Devido à sua elevada capacidade de absorção de água, as pentosanas hidrossolúveis (PHS) apresentam-se como um componente bastante importante na determinação das propriedades viscoelásticas de uma massa para panificação (Jelaca e Hlynka, 1972; Patil *et al.*, 1976; Michniewicz *et al.*, 1991; Izydorczik e Biliaderis, 1995; Courtin e Delcour, 1998). Por exemplo, Patil *et al.* (1976) reportaram a necessidade da presença de PHS em sistemas constituídos por glúten e amido para a obtenção de um volume normal e adequado do pão.

Nos capítulos anteriores foi apresentado o estudo do efeito das pentosanas hidrossolúveis nas propriedades reológicas e moleculares do amido e do glúten. A influência das pentosanas hidrossolúveis no comportamento reológico e dinâmico de amostras constituídas por amido e glúten não foi ainda descrito.

Neste capítulo apresenta-se um estudo preliminar de amostras reconstituídas, compostas por amido, glúten e PHS extraídos a partir das duas variedades portuguesas de trigo em estudo, *Amazonas* e *Sorraia*. À semelhança da abordagem anteriormente efectuada nos capítulos precedentes, realizou-se uma caracterização reológica dos sistemas reconstituídos recorrendo a ensaios de oscilação a baixa amplitude de deformação, e uma caracterização ao nível molecular recorrendo a estudos de espectroscopia de RMN de sólidos.

VII. 2. Materiais e Métodos

VII. 2.1. Amostras

As amostras de glúten, amido e PHS foram obtidas a partir do fraccionamento das farinhas de trigo das variedades AMA e SOR, tal como descrito em § II.2.1.

VII. 2.1.1. Preparação das amostras para o estudo por reologia

Para a caracterização reológica e dinâmica dos sistemas reconstituídos, prepararam-se sistemas de glúten + amido e glúten + amido + PHS.

No caso dos sistemas de glúten + amido, prepararam-se misturas a seco (amostras pulverizadas) com 90% (m/m) de amido e 10% (m/m) de glúten, e sistemas com 85% (m/m) de amido e 15% (m/m) de glúten, para uma análise preliminar do efeito da proporção amido:glúten nas propriedades dos sistemas reconstituídos.

No sentido de estudar o efeito das PHS em sistemas constituídos por glúten e amido, prepararam-se sistemas com uma quantidade constante de glúten (10% m/m), adicionando-se diferentes quantidades de PHS, 0,5% (m/m), 1% (m/m) e 2% (m/m), e diferentes quantidades de amido, 89,5% (m/m), 89% (m/m) e 88% (m/m), respectivamente.

Com o objectivo de estudar o efeito da proporção amido:glúten, prepararam-se sistemas glúten + amido + PHS com uma quantidade constante de PHS (1% m/m), variando-se a quantidade de glúten e amido de modo a perfazer a razão amido/glúten de 19, 11, 9, 7 e 6. A Tabela 7.1 apresenta um resumo das várias misturas preparadas para o estudo das propriedades dos sistemas reconstituídos.

Todas as amostras foram hidratadas a 50% (m/m) com água desionizada, tendo em conta o teor de humidade dos vários componentes constituintes das misturas, e preparadas como anteriormente descrito (§ III.2.2, método 1).

VII. 2.1.2. Preparação das amostras para o estudo por RMN de sólidos

Para a caracterização por RMN dos sistemas reconstituídos apenas foram preparadas amostras glúten + amido, com 10% (m/m) de glúten e 90% (m/m) de amido e amostras glúten + amido + PHS com 10% (m/m) de glúten, 89% (m/m) de amido e 1% (m/m) de PHS, como amostras exemplificativas do efeito da adição de amido ao glúten e do efeito da adição de PHS a amostras constituídas por glúten e amido, respectivamente. As amostras foram hidratadas a 50% (m/m) com água deuterada (D_2O), e preparadas tal como anteriormente descrito (§ III.2.2, método 1).

Tabela 7.1 - Misturas preparadas para o estudo dos sistemas reconstituídos por reologia e por RMN de sólidos (proporção dos componente na amostra seca).

	% Amido (m/m)	% Glúten (m/m)	% PHS (m/m)	Razão Amido/Glúten	Reologia	RMN
Glúten+Amido						
Mistura I	90	10	-	9	✓	✓
Mistura II	85	15	-	6	✓	-
Glúten+Amido+PHS						
Mistura I	89,5	10	0,5	9	✓	-
Mistura II	89	10	1	9	✓	✓
Mistura III	88	10	2	9	✓	-
Glúten+Amido+PHS						
Mistura I	94	5	1	19	✓	-
Mistura II	91	8	1	11	✓	-
Mistura III	89	10	1	9	✓	✓
Mistura IV	87	12	1	7	✓	-
Mistura V	84	15	1	6	✓	-

VII. 2.2. Caracterização reológica dos sistemas reconstituídos

O estudo do comportamento reológico dos sistemas reconstituídos foi realizado igualmente num reómetro de tensão controlada (AR-1000, TA Instruments, New Castle, DE) equipado com uma geometria placa-cone (ângulo 2°, 2 cm diâmetro). O procedimento utilizado e os testes realizados foram semelhantes aos descritos anteriormente (§ V.2.2)

VII. 2.3. Caracterização dos sistemas reconstituídos por RMN de sólidos

Amostras seleccionadas entre os sistemas reconstituídos foram caracterizados por espectroscopia de RMN de sólidos, tendo-se registado espectros de carbono (^{13}C -CP/MAS) e de protão (^1H -MAS).

As condições de aquisição dos espectros foram semelhantes às anteriormente descritas para para o glúten (§ IV.2.3), tendo os espectros de ^1H -MAS sido adquiridos a uma velocidade

de rotação de 10 KHz. Os ensaios de temperatura foram realizados para temperaturas na gama 20-80°C.

VII. 3. Resultados e Discussão

VII. 3.1. Caracterização reológica

VII. 3.1.1. Caracterização reológica dos sistemas glúten + amido

Iniciou-se a análise das propriedades de sistemas reconstituídos com o estudo de sistemas constituídos apenas por glúten e amido. Para tal, prepararam-se sistemas com duas proporções amido:glúten diferentes, 9:1 e 5,7:1, de modo a obter uma informação preliminar acerca do efeito da proporção amido:glúten nas propriedades dos sistemas reconstituídos. Por uma questão de simplificação de resultados, nesta secção apenas se apresentam os resultados relativos às misturas da variedade SOR. Os resultados obtidos para a variedade AMA foram qualitativamente semelhantes, apenas se observando valores inferiores relativamente aos módulos viscoelásticos.

A Figura 7.1 apresenta as curvas de variação do módulo de conservação (G') e da tangente ao ângulo de perda ($\tan \delta = G''/G'$) em função da frequência, para os dois sistemas estudados, antes do tratamento térmico. A presença de uma maior quantidade de glúten provoca o aumento dos valores de G' . Na mistura com 85% (m/m) de amido, a matriz proteica é a responsável pelo valor mais elevado do módulo de conservação. Antes do aquecimento, os grânulos de amido hidratados dispersos na matriz proteica podem reforçar essa matriz, mas é o glúten o principal responsável pelo comportamento viscoelástico observado. As duas misturas apresentaram um comportamento viscoelástico qualitativamente semelhante. Ambos os sistemas apresentaram um comportamento dependente da frequência. A apresentação de um valor mínimo e máximo dos módulos viscoelásticos no sentido das frequências crescentes reflecte um comportamento típico de uma estrutura transiente (Ferry, 1980).

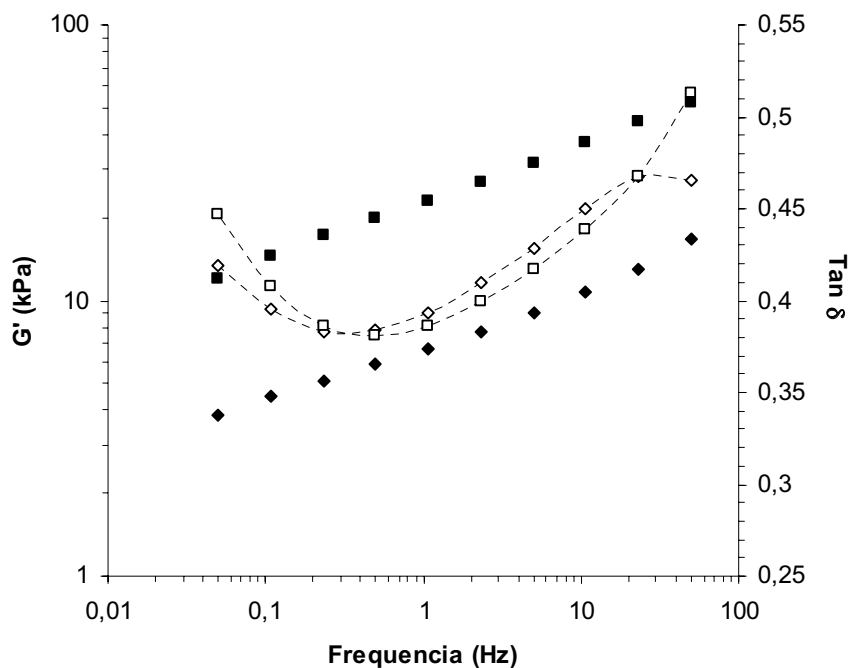


Figura 7.1 - Espectros mecânicos dos sistemas de glúten + amido (50% H₂O m/m) a 85% (■, □) e 90% (◆, ◇) de amido (m/m), para a variedade Sorraia, adquiridos a 20°C, antes do tratamento térmico; símbolos a cheio representam a variação do módulo de conservação, G' , com a frequência de oscilação; símbolos abertos representam a variação da tangente de perda, $\tan \delta$, com a frequência de oscilação.

O comportamento das misturas hidratadas a 50% (m/m), durante o tratamento térmico está apresentado na Figura 7.2. Ambos os sistemas apresentaram curvas com um perfil semelhante às curvas observadas para as amostras de amido (§ VI.3.1.2) e de farinha (§ III.3.3.1.3) o que já seria de esperar tendo em conta a maior percentagem de amido relativamente à quantidade de glúten presente na amostra e a semelhante proporção amido: glúten encontrada na farinha. O comportamento térmico demonstrado pela mistura glúten+amido reflecte essencialmente o comportamento do amido durante a sua gelatinização.

A mistura com maior quantidade de amido apresentou uma maior temperatura de gelatinização, definida como anteriormente (T_{gel} , § VI.3.1.2) bem como um maior valor de $G'_{máx}$. As misturas com 90% e 85% de amido apresentaram valores de T_{gel} de 51,7°C e 50,0°C, respectivamente. Seria de esperar que uma maior percentagem de amido possibilitasse uma maior interacção entre grânulos, mesmo para menores graus de

intumescimento, observando-se menores temperaturas de gelatinização. No entanto, isto não se verifica, observando-se sim, um efeito contrário provavelmente devido à menor disponibilidade de água para o inchamento e gelatinização dos grânulos, relacionada com a diferente afinidade do amido e do glúten para a água. Uma menor disponibilidade de água para o amido gelatinizar reflecte-se num processo mais moroso, necessitando, por isso, do fornecimento de uma maior quantidade de energia para que a condição intumescimento de empacotamento dos grânulos e o consequente aumento brusco dos valores dos módulos viscoelásticos se verifique.

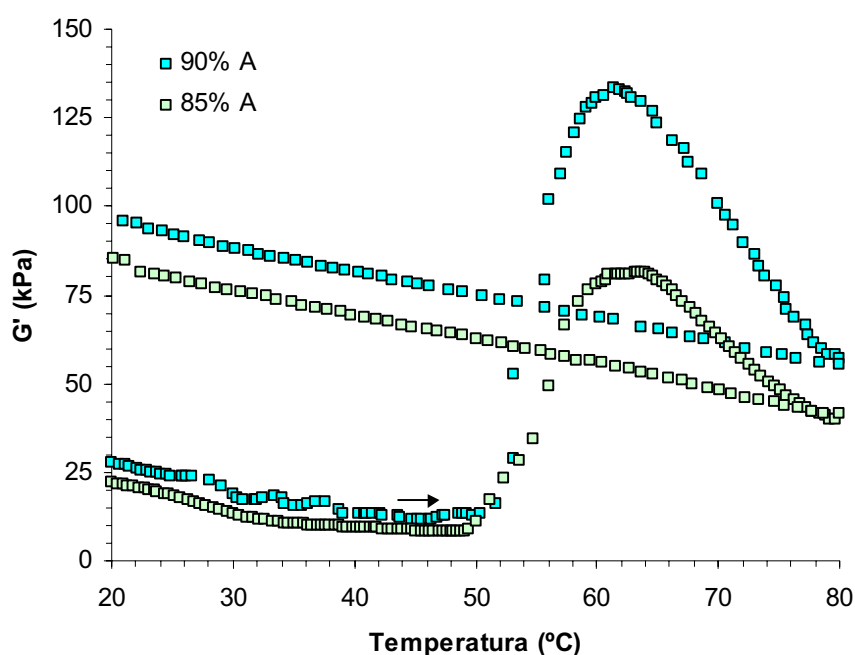


Figura 7.2 - Evolução do módulo de conservação (G') dos sistemas de glúten + amido (50% H_2O m/m) a 85% e 90% de amido (m/m), da variedade Sorraia, durante o aquecimento (20-80°C; 2°C/min, 0,5 Hz) e o arrefecimento (80-20°C; 2°C/min, 0,5 Hz)

O valor de $G'_{\text{máx}}$ foi também inferior para a mistura com menor quantidade de amido. A mistura a 85% de amido apresentou um valor máximo de G' de 81,2 kPa enquanto que a mistura a 90% de amido apresentou um valor respectivo de 133,2 kPa. A diferença no valor máximo de G' , correspondente ao ponto máximo de interações grânulo-grânulo, traduz a maior quantidade de amido presente na mistura, agora o componente com papel determinante nas propriedades de gelificação do sistema.

Durante o arrefecimento, ambas as amostras apresentaram perfis qualitativamente semelhantes, observando-se um aumento do módulo de G' ao longo de todo o arrefecimento. O aumento de G' aqui observado foi bastante mais pronunciado do que o observado para a amostra de amido sozinho (§ VI.3.1.2), revelando a contribuição do glúten presente nas misturas.

O comportamento viscoelástico dos géis formados foi analisado através da aquisição de espectros de mecânicos após o arrefecimento das amostras, a 20°C. As curvas mecânicas estão apresentadas na Figura 7.3. Após o arrefecimento, ambos os sistemas apresentaram um comportamento bastante semelhante, não se verificando diferenças significativas nos valores dos módulos viscoelásticos apresentados.

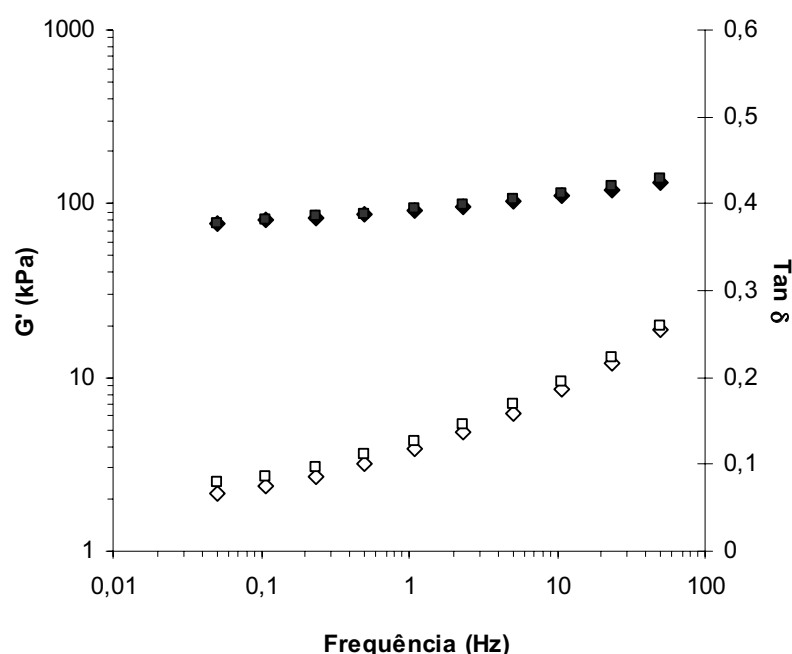


Figura 7.3 - Espectros mecânicos dos sistemas de glúten + amido (50% H_2O m/m) a 85% (■, □) e 90% (◆, ◇) de amido (m/m), para a variedade Sorraia, adquiridos a 20°C, depois do tratamento térmico; símbolos a cheio representam a variação do módulo de armazenamento, G' , com a frequência de oscilação; símbolos a branco representam a variação da tangente ao ângulo de perda, $\tan \delta$, com a frequência de oscilação.

Claramente, após gelificação do amido, este é o componente que exerce o papel mais importante no comportamento viscoelástico dos géis formados; a pequena diferença na

quantidade de amido não exerce um efeito significativo no comportamento mecânico das amostras após o tratamento térmico. A tangente ao ângulo de perda ($\tan \delta = G''/G'$) apresentou valores bastante mais baixos do que os registados antes do tratamento térmico, apresentando ainda um perfil bastante diferente. Os menores valores de $\tan \delta$ apresentados reflectem o maior grau de estruturação dos sistemas, prevalecendo o carácter elástico.

VII. 3.1.2. Caracterização reológica dos sistemas glúten + amido + PHS

VII. 3.1.2.1. Efeito da variação da concentração de PHS, a uma concentração de glúten constante

No sentido de estudar o efeito das PHS nas propriedades reológicas dos sistemas glúten+amido, prepararam-se misturas constituídas por glúten, amido e PHS. Numa primeira fase, analisaram-se sistemas com uma concentração constante de glúten (10% m/m), variando-se a concentração de PHS numa gama de 0,5-2% (m/m), variando também a quantidade de amido de acordo com a quantidade de PHS adicionada. Após hidratação a 50% (m/m) as concentrações finais de PHS foram de 0,2%, 0,5% e 1% (m/m), respectivamente para as concentrações 0,5%, 1% e 2% PHS nas amostras no estado seco.

A adição de PHS ao sistema amido-glúten origina um efeito complexo, dependente da quantidade adicionada de polissacarídeo não gelificante. Para baixa quantidade de PHS o efeito parece ser positivo para o desenvolvimento da matriz macromolecular, verificando-se um aumento de G' e uma diminuição de $\tan \delta$, indicando o reforço da matriz e o aumento do seu carácter elástico. Para quantidades mais elevadas de PHS, o efeito inverte-se: G' diminui e o carácter viscoso aumenta (maior $\tan \delta$).

O efeito da adição de PHS aos sistemas glúten+amido apresentou algumas diferenças comparativamente ao efeito da adição de PHS aos sistemas de glúten (§ V.3.1.1), antes do tratamento térmico. A adição de PHS aos sistemas de glúten isolado conduziu a um aumento dos valores de G' e de $\tan \delta$, revelando o aumento mais pronunciado do carácter viscoso. O amido desempenhará agora um papel importante. A descida dos valores de G' observada para os sistemas glúten+amido+PHS com o aumento da concentração de PHS

deverá estar relacionado com o desenvolvimento de uma matriz viscosa pelas PHS, diminuindo assim o carácter elástico de todo o sistema.

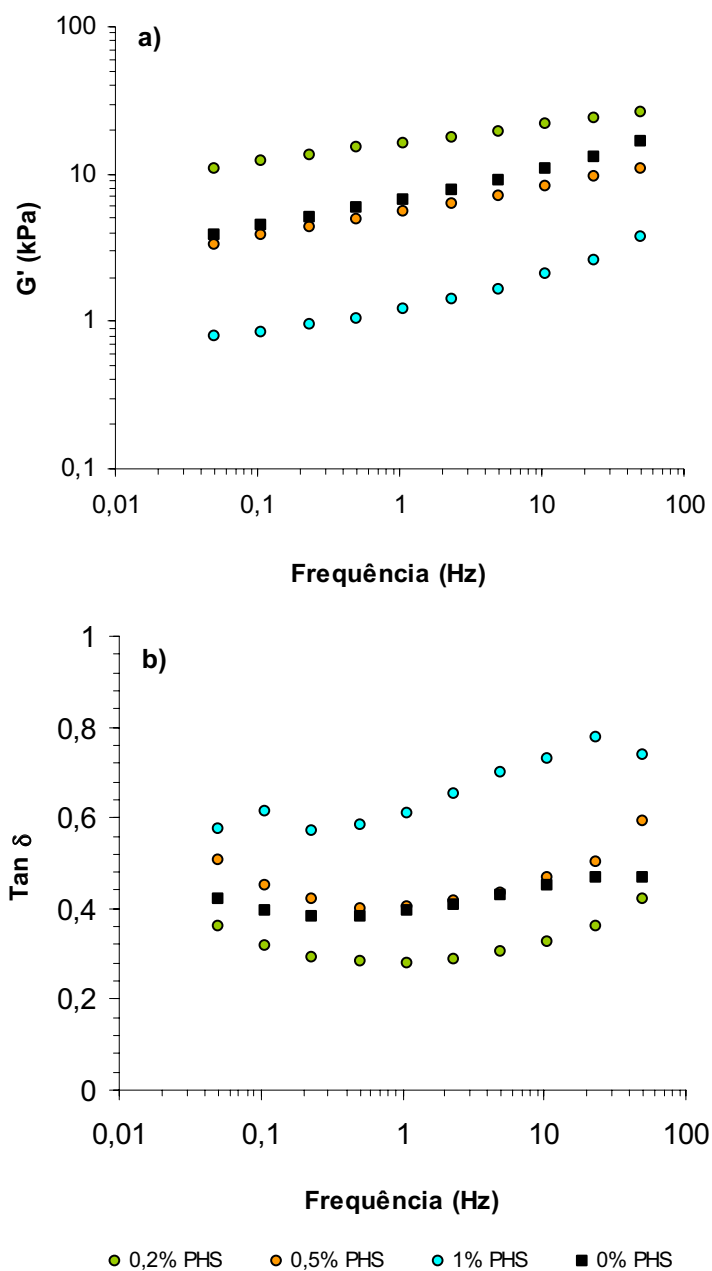


Figura 7.4 - Espectros mecânicos dos sistemas de glúten + amido + PHS (50% H₂O m/m) a uma concentração de glúten constante (10% m/m), com 0,2%, 0,5% e 1% de PHS (m/m), para a variedades Sorraia. Espectros adquiridos a 20°C, antes do tratamento térmico. a)- variação do módulo de armazenamento, G' , e b)- variação da tangente de perda, $\tan \delta$, com a frequência de oscilação.

O comportamento das misturas glúten+amido+PHS durante o ciclo de aquecimento/arrefecimento (20-80-20°C) foi acompanhado através da medição dos módulos viscoelásticos durante ensaios de varrimento de temperatura. A Figura 7.5 apresenta as curvas de aquecimento/arrefecimento para as misturas glúten+amido+PHS hidratadas a 50% (m/m), com 0,2%, 0,5% e 1% (m/m) de PHS.

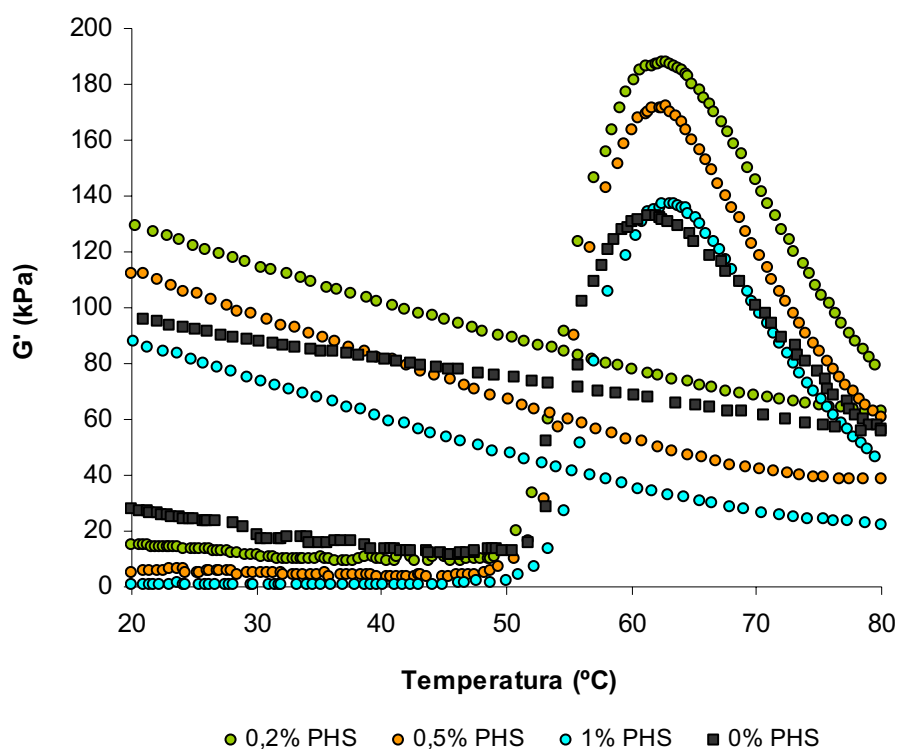


Figura 7.5 -Evolução do módulo de armazenamento (G') dos sistemas de glúten + amido + PHS (50% H_2O m/m) a uma concentração constante de glúten (10% m/m) e a 0,2%, 0,5% e 1% de PHS (m/m), para a variedade Sorraia, durante o aquecimento (20-80°C; 2°C/min, 0,5 Hz) e o arrefecimento (80-20°C; 2°C/min, 0,5 Hz)

Durante o aquecimento e arrefecimento, todas as misturas apresentaram curvas de varrimento de temperatura com o mesmo perfil, sendo este bastante semelhante ao perfil das misturas glúten+amido.

O aumento da concentração de PHS contribuiu para o aumento da temperatura de gelatinização do amido, bem como para diminuição do valor de $G'_{máx}$ e deslocação da $T_{G'_{máx}}$, efeito semelhante ao verificado para os sistemas de amido + PHS (§ VI.3.1.3). Mais uma vez se fez aqui sentir o efeito da competição pela água entre os vários componentes da

mistura. A adição de glúten e PHS ao sistema de amido diminuiu a disponibilidade de água para o processo de gelatinização do amido, pelo que mais energia terá que ser fornecida ao sistema, tendo em conta todo o processo hidrotérmico da gelatinização do amido.

A Tabela 7.2 apresenta uma comparação das temperaturas de gelatinização e dos valores de $G'_{\text{máx}}$ para os sistemas reconstituídos estudados.

Tabela 7.2 - Parâmetros associados com as alterações viscoelásticas iniciais ocorridas durante o aquecimento de amostras de amido+glúten+PHS a 50% (m/m) de hidratação e concentração de glúten constante (10% glúten m/m).

	% PHS			
	0%	0,2%	0,5%	1%
T_g (°C)	51,7	49,6	50,6	52,2
$G'_{\text{máx}}$ (kPa)	133,2	187,8	171,2	137,1
$T_{G'_{\text{máx}}}$ (°C)	61,4	62,5	62,5	63,1

Durante a descida da temperatura, todas as amostras demonstraram a mesma tendência, observando-se uma subida contínua dos valores de G' ao longo da gama de temperaturas analisada. Comparativamente aos sistemas sem PHS, as curvas de arrefecimento apresentaram um maior declive indicando, interessantemente, a ocorrência de um maior grau de estruturação. A mistura com maior percentagem de PHS apresentou módulos viscoelásticos mais baixos ao longo de toda a gama de temperaturas, sugerindo que a adição de PHS parece afectar o processo de enrijecimento do gel de amido. Resultados idênticos foram observados para as misturas amido+PHS.

O comportamento viscoelástico após o tratamento térmico foi analisado e comparado com o comportamento registado antes do ciclo de aquecimento/arrefecimento. Os espectros mecânicos obtidos após o tratamento térmico estão apresentados na Figura 7.6. Todos os sistemas glúten+amido+PHS apresentaram uma subida dos valores de G' , comparativamente aos valores registados anteriormente.

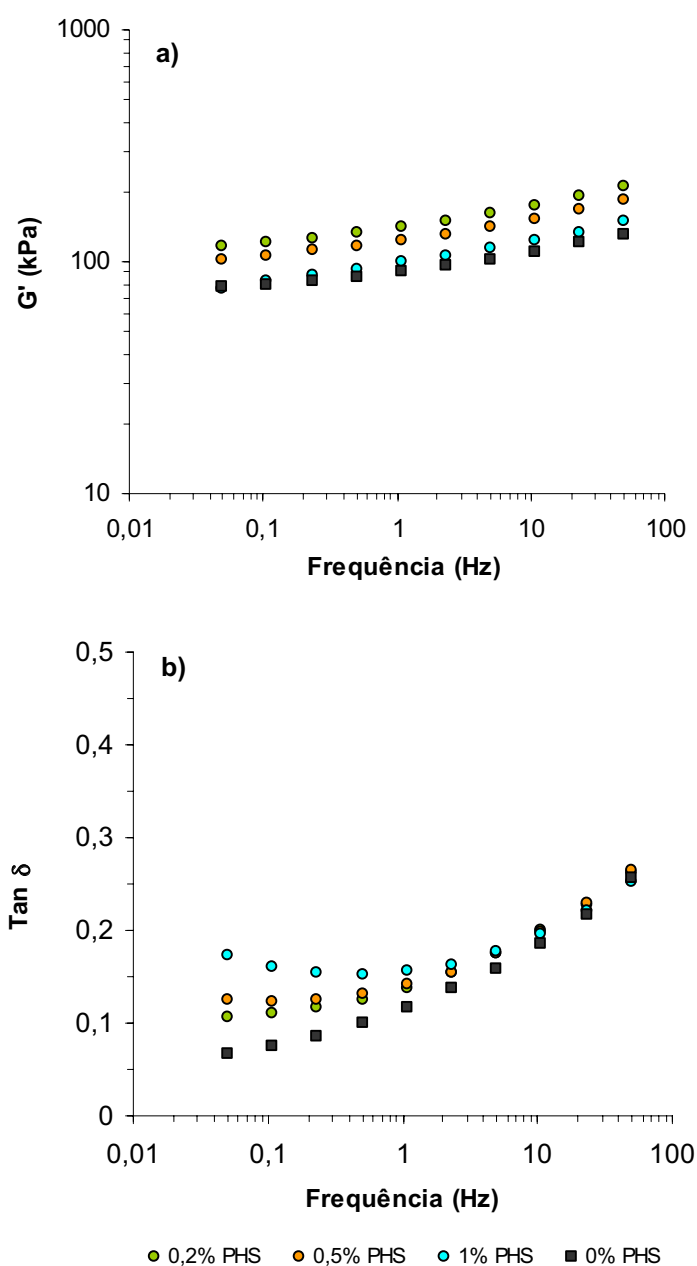


Figura 7.6 - Espectros mecânicos dos sistemas de glúten + amido + PHS (50% H₂O m/m) a uma concentração de glúten constante (10% m/m), com 0,2%, 0,5% e 1% de PHS (m/m), para a variedades Sorraia. Espectros adquiridos a 20°C, depois do tratamento térmico. a)- variação do módulo de armazenamento, G' , e b)- variação da tangente de perda, $\tan \delta$, com a frequência de oscilação.

A subida dos valores de G' resulta de todo o processo de estruturação dos sistemas observado durante a fase de arrefecimento. O declive apresentado pelas curvas é muito

pequeno, aproximando-se de um comportamento independente da frequência. Paralelamente à subida dos valores de G' , no conjunto geral das amostras observou-se a descida dos valores de $\tan \delta$ ($\tan \delta < 0,3$) relativamente aos registados antes do aquecimento ($0,3 < \tan \delta < 0,8$), como resultado do aumento mais pronunciado do módulo de armazenamento relativamente ao módulo de perda ($\tan \delta = G''/G'$), após o tratamento térmico. Este resultado evidencia um comportamento mais elástico como resultado da alteração da estrutura dos sistemas devido ao ciclo de aquecimento / arrefecimento. O módulo de G'' apresentou um comportamento um pouco diferente relativamente ao observado antes do tratamento térmico, tal como se pode deduzir pela forma da curva da tangente de perda.

À semelhança do observado antes do aquecimento, a presença de PHS parece ter exercido um efeito positivo no reforçamento da estrutura da matriz do sistema apenas para baixas concentrações de PHS. Relativamente à amostra sem PHS, o aumento da concentração de PHS conduziu a um aumento menos acentuado do G' e aumento do $\tan \delta$. Apesar do tratamento térmico ter exercido efeito sobretudo sobre o amido e o glúten presentes, com o consequente aumento geral do carácter elástico dos sistemas, as PHS contribuem para a manifestação de um carácter mais viscoso, numa extensão dependente da concentração de PHS presente.

VII. 3.1.2.2. Efeito da variação da razão amido/glúten, a uma concentração de PHS constante

Numa segunda fase desta abordagem preliminar ao estudo das propriedades reológicas dos sistemas reconstituídos, analisou-se o efeito da variação da razão amido/glúten, mantendo uma concentração constante de PHS (0,5% m/m).

As diferentes quantidades de amido e glúten claramente afectaram as propriedades viscoelásticas dos sistemas reconstituídos. A Figura 7.7 apresenta a variação do módulo de armazenamento e da tangente de perda em função da frequência para os sistemas com 0,5% de PHS e diferente razão amido/glúten.

Tal como se pode observar na Figura 7.7a, a diminuição da razão amido/glúten reflectiu-se no aumento dos valores de G' , tendo os sistemas com menor razão apresentado valores de

G' cerca de cem vezes superiores aos valores apresentados pelos sistemas com maior razão amido/glúten.

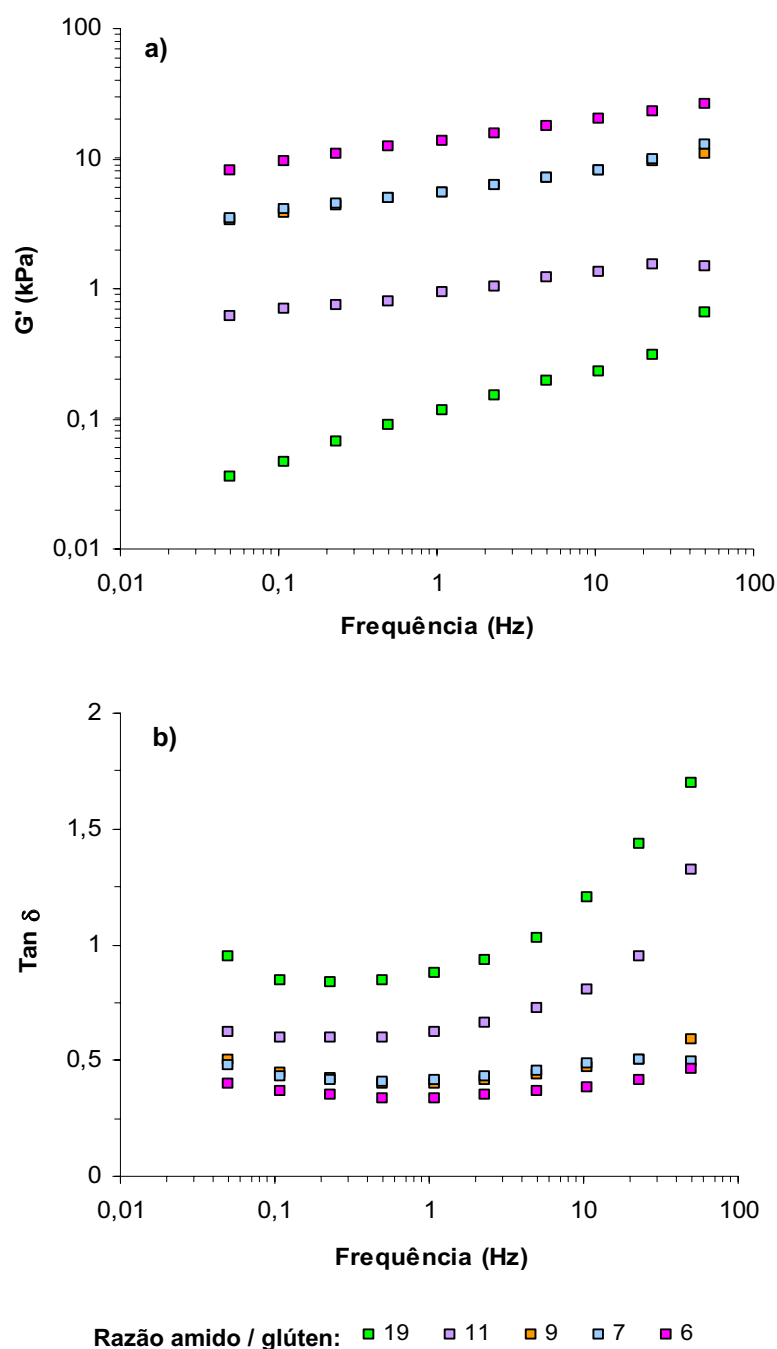


Figura 7.7 - Efeito da variação da razão amido/glúten nos espectros mecânicos dos sistemas de glúten + amido + PHS (50% H_2O m/m), a uma concentração de PHS constante (0,5% m/m) para a variedade Sorraia; espectros adquiridos a 20°C, antes do tratamento térmico; a)- variação do módulo de armazenamento, G' , e b). variação da tangente de perda, $\tan \delta$, com a frequência de oscilação.

Este resultado surge como reflexo de uma maior concentração de glúten nos sistemas com menor razão amido/glúten, os quais manifestam uma estrutura mais forte, como seria de esperar já que, após hidratação do sistema reconstituído e antes do aquecimento, o glúten é o principal responsável pelas propriedades viscoelásticas destas amostras.

Similarmente ao aumento dos valores de G' , o fortalecimento da matriz proteica conduziu à diminuição dos valores de $\tan \delta$, o que confirma a manifestação de um comportamento mais elástico devido ao aumento do teor em glúten. Os sistemas com maior quantidade de amido (razão amido/glúten=19) apresentaram os valores mais baixos de G' , tendo também apresentado uma maior dependência do comportamento viscoelástico relativamente à gama de frequências analisadas.

O comportamento dos sistemas durante o ciclo de aquecimento/arrefecimento (20-80-20°C) está apresentado na Figura 7.8. Durante o aquecimento, todas as misturas apresentaram o mesmo perfil, característico de sistemas constituídos maioritariamente por amido. A variação da razão amido/glúten não exerceu influência sobre a temperatura de gelatinização, tendo esta apresentado um valor relativamente constante ($\pm 51^\circ\text{C}$). Note-se no entanto que, à semelhança do observado para o sistema glúten + amido com maior proporção de amido, o sistema com maior razão amido:glúten (maior quantidade de amido) apresentou uma variação de G' bastante mais brusca na vizinhança da temperatura de gelatinização.

A diminuição da razão amido/glúten reflectiu-se ainda na diminuição de $G'_{\text{máx}}$, tendo o sistema com menor razão (maior quantidade de glúten e menor quantidade de amido) apresentado um valor de $G'_{\text{máx}}$ cerca de cem vezes inferior ao valor apresentado pelo sistema com maior razão. Neste caso, apesar da maior quantidade de glúten nas amostras com menor razão amido/glúten, a menor quantidade de amido será responsável pela diminuição do $G'_{\text{máx}}$, já que por aquecimento, é a gelatinização do amido que domina as alterações verificadas no comportamento viscoelástico do sistema. Para além do efeito de concentração de cada componente, a presença de maior quantidade de glúten pode ainda contribuir para a diminuição da quantidade de água disponível para a gelatinização do amido. Nos sistemas com maior razão amido/glúten, a maior quantidade de amido e, ao mesmo tempo, a menor quantidade de glúten, contribuíram para um maior grau de interações grânulo-grânulo, apresentando estes sistemas os valores mais elevados de

$G'_{\text{máx}}$. Valores de $G'_{\text{máx}}$ mais elevados foram igualmente observados para os sistemas glúten + amido com maior quantidade de amido (ver Figura 7.2).

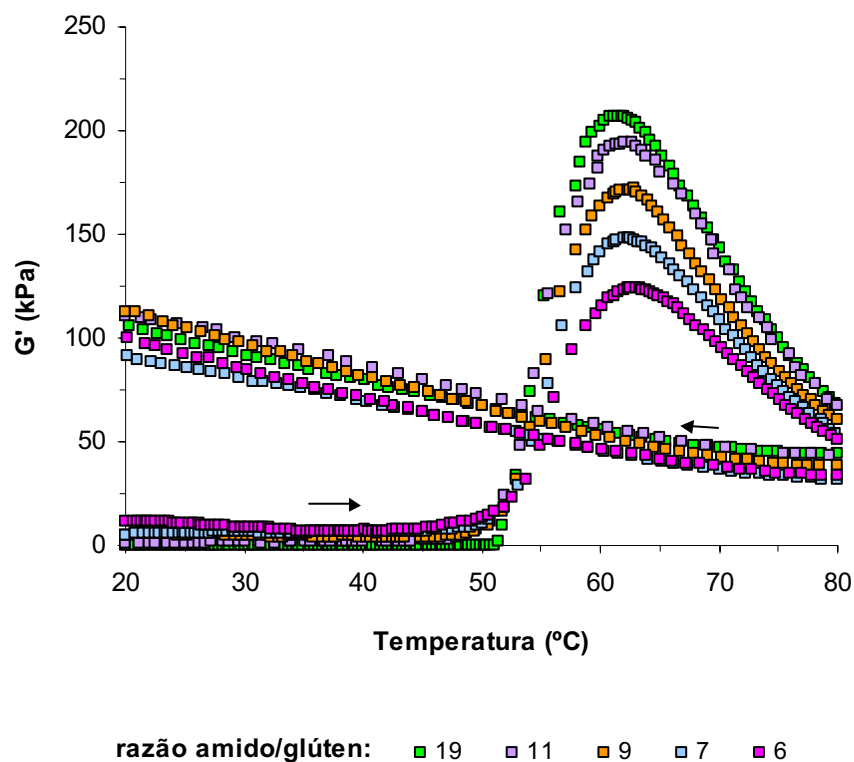


Figura 7.8 - Evolução do módulo de armazenamento (G') dos sistemas de glúten + amido + PHS (50% H_2O m/m) da variedade Sorraia, a uma concentração constante de PHS (0,5% m/m), com diferente razão amido/glúten, durante o aquecimento (20-80°C; 2°C/min, 0,5 Hz) e o arrefecimento (80-20°C; 2°C/min, 0,5 Hz)

Durante o arrefecimento, todas as misturas apresentaram um perfil também semelhante, observando-se um aumento gradual dos valores de G' ao longo de toda a gama de temperaturas. Apesar das diferenças observadas durante o aquecimento dos sistemas, durante o arrefecimento todas as amostras apresentaram valores de G' próximos, observando-se, apenas, valores ligeiramente inferiores para os sistemas com menor razão amido/glúten (maior quantidade de glúten).

Após o arrefecimento, os sistemas foram novamente sujeitos a um ensaio de varrimento de frequência. O tratamento térmico teve como efeito a subida dos valores de G' e uma aproximação das propriedades viscoelásticas entre os diferentes sistemas (Figura 7.9).

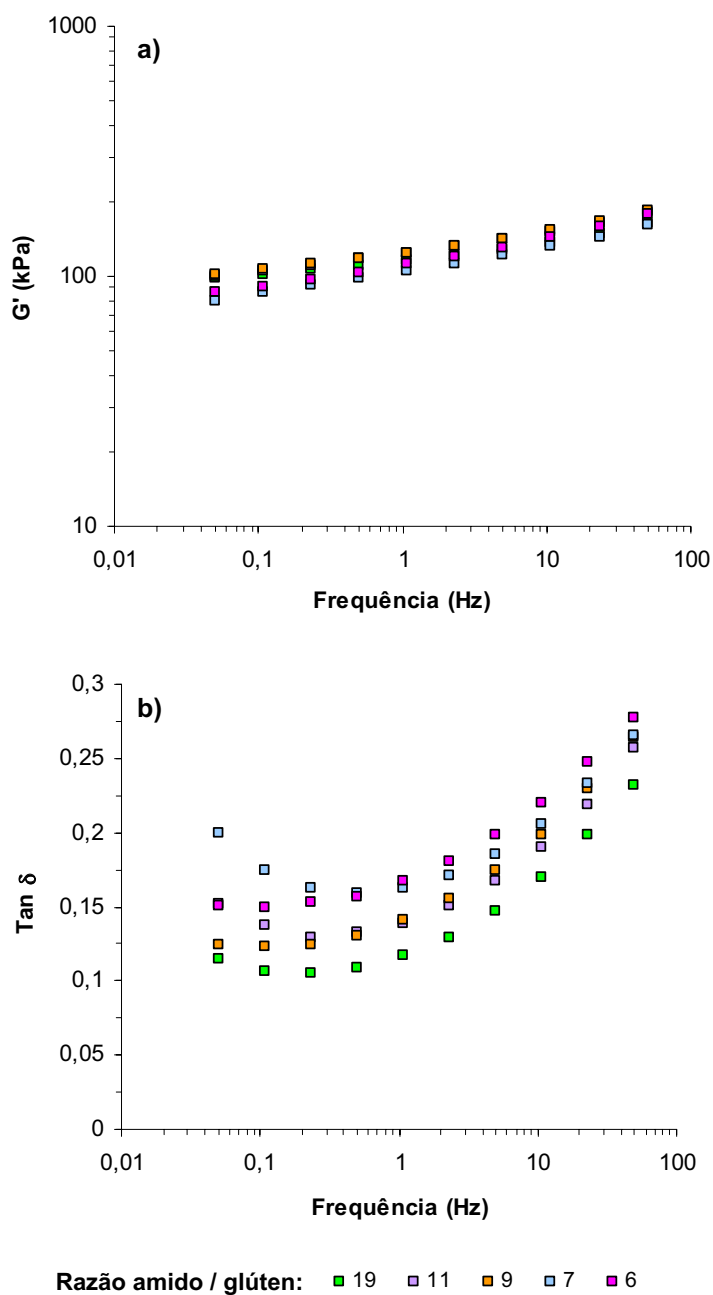


Figura 7.9 - Efeito da variação da razão amido/glúten nos espectros mecânicos dos sistemas de glúten + amido + PHS (50% H₂O m/m), a uma concentração de PHS constante (0,5% m/m) para a variedade Sorraia; espectros adquiridos a 20°C, depois do tratamento térmico; a)- variação do módulo de armazenamento, G' , e b)- variação da tangente de perda, $\tan \delta$, com a frequência de oscilação.

Contrariamente ao observado antes do aquecimento, após o tratamento térmico as diferentes misturas glúten+amido+PHS apresentaram valores de G' bastante semelhantes ao longo de toda a gama de frequências analisada (Figura 7.9a). O comportamento viscoelástico foi também bastante similar (Figura 7.9b) tendo os diferentes sistemas apresentado valores de $\tan \delta$ bastante semelhantes entre si. Como resultado da subida dos valores de G' , os sistemas apresentaram valores de $\tan \delta$ mais baixos, sinónimo de um comportamento predominantemente mais elástico.

A semelhança dos valores de G' observada entre os diferentes sistemas após o tratamento térmico, parece indicar que, independentemente da razão amido: glúten, o comportamento após o tratamento térmico é claramente ditado pelo amido.

VII. 3.2. Caracterização dos sistemas reconstituídos por RMN de sólidos

Na caracterização espectroscópica dos sistemas reconstituídos efectuaram-se estudos de espectroscopia de RMN de sólidos em amostras constituídas por 10% (m/m) de glúten + 90% (m/m) de amido, e amostras com 10% (m/m) de glúten + 89% (m/m) amido + 1% (m/m) de pentosanas hidrossolúveis (concentração final de PHS de 0,5% após hidratação). Apenas se estudaram as misturas para a variedade SOR. Os sistemas foram caracterizados por espectroscopia de RMN de ^{13}C -CP/MAS e ^1H -MAS, tendo-se adquirido espectros de amostras no estado seco e de amostras hidratadas a 50% (m/m) com D_2O . As amostras hidratadas foram igualmente sujeitas a um tratamento térmico, tendo-se registado espectros de ^1H -MAS a várias temperaturas na gama 20-80-20°C.

VII. 3.2.1. Caracterização por espectroscopia de ^{13}C -CP/MAS

VII. 3.2.1.1. Efeito da hidratação

A Figura 7.10 apresenta os espectros de ^{13}C -CPMAS das amostras no estado seco, de glúten (Figura 7.10a), glúten+amido (Figura 7.10b) e glúten+amido+PHS (Figura 7.10c) da variedade SOR. O espectro da amostra de glúten é aqui apresentado novamente de modo a facilitar a comparação entre todos os sistemas.

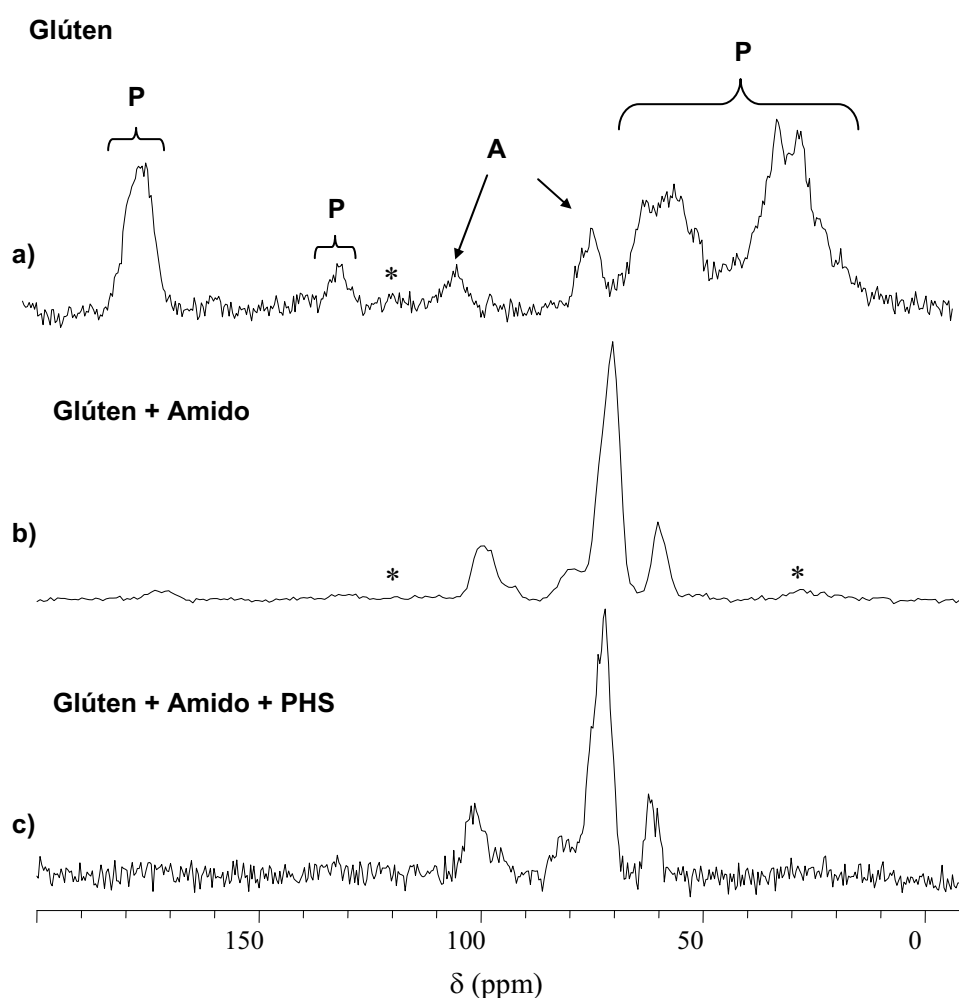


Figura 7.10 - Espectros ^{13}C -CP/MAS de amostras secas de a)- glúten SOR, ns= 1704 , LB=30 e b)- amostra reconstituída glúten + 90% amido ns=1632, LB= 20; c)- amostra reconstituída 10% glúten + 89% amido + 1% PHS, LB=20, ns=76; todos os espectros adquiridos a SR= 6 kHz; P- proteína, A - amido; * - bandas laterais de rotação

A adição de amido ao glúten conduziu a diferenças bastante significativas no espectro de ^{13}C -CP/MAS do glúten (Figura 7.10b). Os espectros de carbono dos sistemas reconstituídos apresentaram um perfil completamente diferente do perfil dos espectros do glúten, evidenciando essencialmente a contribuição do amido. Os espectros aqui apresentados para as amostras reconstituídas assemelham-se bastante aos espectros de ^{13}C -CP/MAS observados para as farinhas (§ III.3.3.1) apresentando um perfil dominado pelos sinais derivados das ressonâncias dos carbonos C6 (62 ppm), C2-C5 (72 ppm) e C1 (98-

101 ppm) dos anéis de glucose do amido. Nestes espectros é ainda possível identificar a contribuição do glúten, tal como evidenciado pelos sinais a 29 ppm, 130 ppm e 172 ppm derivados das ressonâncias dos carbonos dos grupos carbonilo, dos carbonos aromáticos e dos carbonos alifáticos, respectivamente.

A hidratação dos sistemas reconstituídos contribuiu com algumas alterações nos espectros de ^{13}C -CP/MAS, tal como se pode verificar na Figura 7.11 que apresenta os espectros de ^{13}C -CP/MAS das amostras dos sistemas de glúten+amido (Figura 7.11a), e glúten+amido+PHS (Figura 7.11b) hidratados a 50% (m/m) com D_2O .

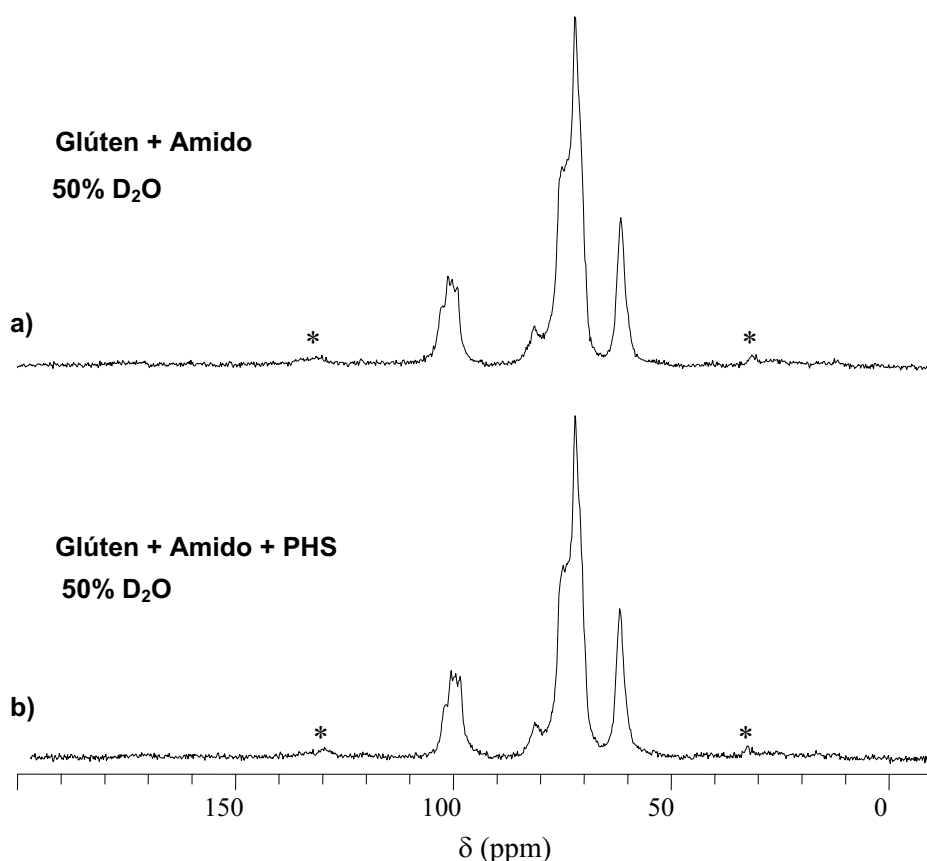


Figura 7.11 - Espectros ^{13}C /CPMAS de amostras hidratadas de a)- amostra reconstituída 10% glúten + 90% amido ns= 20545, LB= 20; b)- amostra reconstituída 10% glúten + 89% amido + 1% PHS , LB=20 , ns=76; todos os espectros adquiridos a SR= 6 kHz; * - bandas laterais de rotação

Com a hidratação, a razão sinal/ruído diminuiu relativamente aos espectros das amostras secas como resultado de uma maior mobilização resultante do efeito de plasticização pela

água. Para ambos os sistemas, o sinal a 62 ppm tornou-se bastante mais definido e mais resolvido. Tal como observado para os sistemas de amido, o sinal do carbono C1 (98-102 ppm) apresentou uma configuração diferente relativamente aos espectros das amostras secas, como resultado da alteração do ambiente químico envolvente. Os sinais derivados da contribuição proteica diminuíram bastante de intensidade devido ao maior aumento relativo da intensidade dos sinais do amido. A adição de PHS à amostra glúten+amido (Figura 7.11b) não originou qualquer efeito visível ao nível dos espectros de ^{13}C -CP/MAS.

VII. 3.2.2. Caracterização por espectroscopia de ^1H -MAS

A caracterização por espectroscopia de RMN de ^{13}C -CP/MAS dos sistemas glúten+amido e glúten+amido+PHS foi complementada através da aquisição de espectros ^1H -MAS. Para cada um dos sistemas adquiriram-se espectros de protão em amostras no estado seco e no estado hidratado.

VII. 3.2.2.1. Efeito da hidratação

A Figura 7.12 apresenta os espectros de ^1H -MAS das amostras dos sistemas reconstituídos no estado seco da variedade SOR, adquiridos 14,5 KHz. O sistema glúten+amido+PHS (Figura 7.12b) apresentou um espectro com um perfil bastante diferente do sistema glúten+amido. Aquele sistema apresentou um espectro mais largo, centrado a 4,8 ppm resultante da presença de água residual, podendo-se ainda observar a contribuição de lípidos residuais a 1,3 ppm. O sistema sem PHS apresentou um espectro mais resolvido, observando-se a definição de um maior número de sinais. A contribuição lipídica apresenta-se como o sinal dominante com as ressonâncias a 0,9-3,8 ppm, observando-se ainda a contribuição de água residual a 5,4 ppm.

A aquisição de espectros de ^1H -MAS com eco de spin, com um tempo de espera $\tau = 1\text{ms}$, permitiu a observação de um maior número sinais, sobretudo para o sistema com PHS (Figura 7.13).

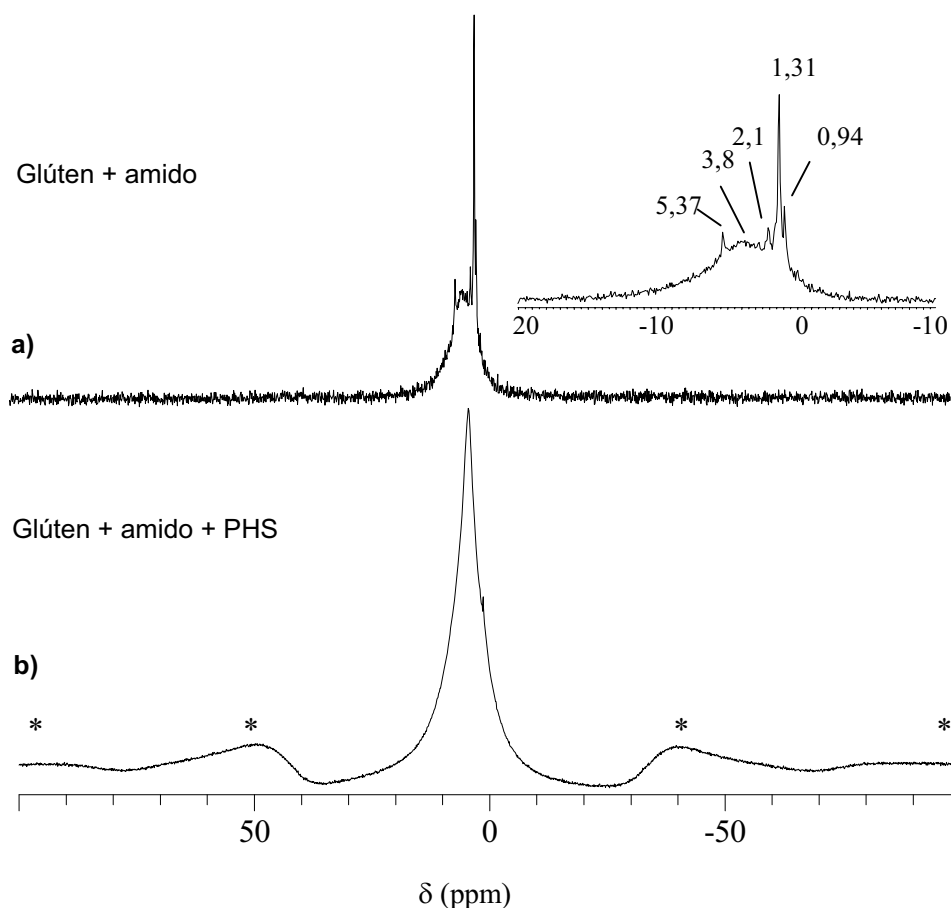


Figura 7.12 - Espectros ^1H -MAS dos sistemas reconstituídos no estado seco, SR=14,5 KHz; a) 10% Glúten + 90% amido, ns=24; b)- 10% Glúten + 89% amido + 1% PHS, ns=24; *- bandas laterais de rotação

Tal como se pode observar na Figura 7.13a o espectro de ^1H com eco de spin da amostra glúten+amido+PHS apresentou uma maior resolução do que o respectivo espectro de ^1H -MAS, conseguindo-se definir uma maior quantidade de sinais. Em ambos os espectros de ^1H com spin-echo das amostras glúten+amido (Figura 7.13b) e glúten+amido+PHS é possível identificar a contribuição dos protões metílicos a 0,94 ppm e 1,3 ppm, sendo estes os sinais mais intensos, indicadores da elevada mobilidade destes protões. A 2,1 ppm e a 2,7 ppm surgem as ressonâncias dos protões alifáticos resultantes da contribuição de lípidos residuais e de proteína. A 5,4 ppm surge a contribuição de lípidos residuais. No espectro da amostra glúten+amido+PHS o sinal derivado da água (4,5 ppm) encontra-se menos resolvido e é o sinal menos intenso, o que indica que a água residual presente se encontra em pouca quantidade. Na amostra glúten+amido o sinal da água desapareceu o

que indica que mesmo em pequena quantidade, a amostra glúten+amido+PHS apresenta maior quantidade de água residual do que a amostra glúten+amido.

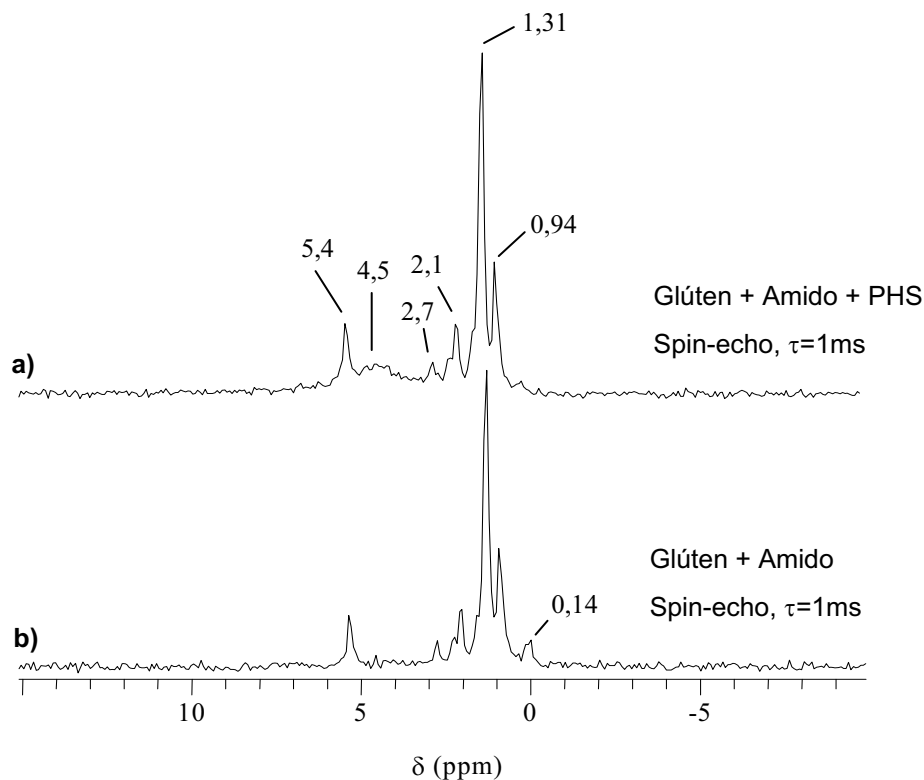


Figura 7.13 - Espectros ^1H -MAS com spin-echo das misturas no estado seco a) 10% Glúten + 89% amido + 1%PHS, ns=48; e b) 10% Glúten + 90% amido, ns= 98; espectros adquiridos com SR= 14,5 kHz; $\tau = 1\text{ ms}$

A hidratação dos sistemas conduziu a grandes alterações nos espectros de ^1H -MAS, tal como se pode verificar na Figura 7.14 que apresenta os espectros de ^1H das amostras glúten+amido e glúten+amido +PHS da variedade SOR, hidratadas a 50% (m/m) com D_2O . O espectro da amostra de glúten hidratada é igualmente apresentado de modo a facilitar a comparação com os outros espectros. A atribuição dos sinais está apresentada na Tabela 7.6 e foi baseada nas atribuições efectuadas anteriormente para as amostras de glúten e glúten+ PHS (IV.3.2.2, Tabela 4.2), e de amido e amido+PHS (§ VI.3.3.2.2, Tabela 6.5).

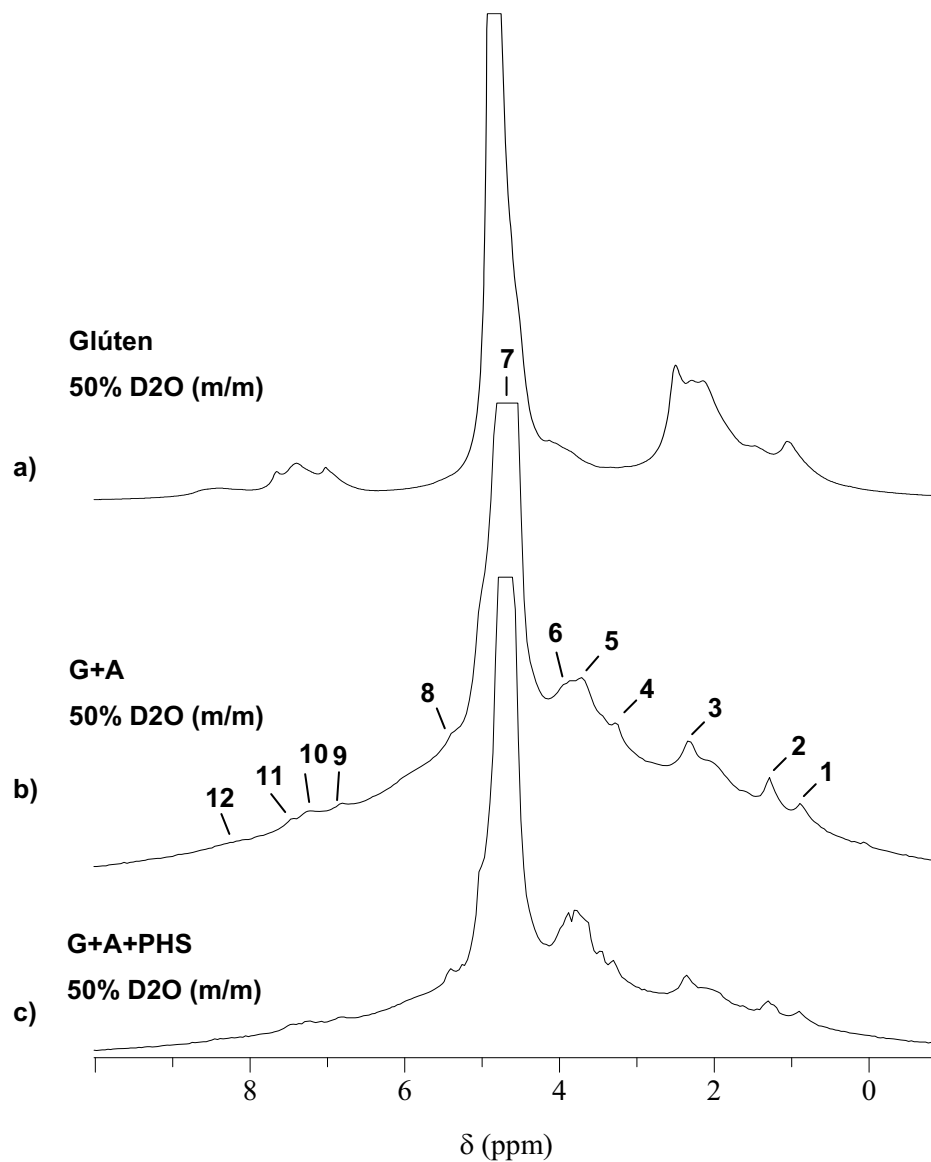


Figura 7.14 - Espectros ^1H -MAS das amostras hidratadas 50% (m/m): a)-Glúten SOR, 6 kHz, ns=32 ; b) mistura 10% Glúten + 90% amido, 13 kHz, ns=24; c) mistura 10% Glúten + 89% amido + 1% PHS, 15 kHz, ns= 80

Tal como se pode observar, para ambas as amostras glúten+amido e glúten+amido +PHS, a hidratação promoveu a definição de uma maior quantidade de sinais, como resultado de uma maior mobilização introduzida pelo efeito de plasticização da água. Todos os espectros apresentaram um perfil dominado pelo pico HOD, centrado a 4,9 ppm, 4,8 ppm e

4,7 ppm, respectivamente nos espectros das amostras de glúten, glúten+amido e glúten+amido +PHS.

Tabela 7.3 - Atribuições dos sinais dos espectros de RMN de ^1H do estado sólido das amostras de glúten+amido e glúten+amido +PHS, baseadas nas atribuições efectuadas anteriormente para as amostras de glúten e glúten+ PHS^a e de amido e amido+PHS^b

Pico nº	δ (ppm)	Atribuição	Componente
1	1,1	CH_3-	Lípidos residuais + proteína
2	2,2	CH_2-	Proteína + lípidos residuais
3	2,4	$-\text{CH}_2-$	
4	3,5	$-\text{CH}-$	Proteína (região alfa) + Amido (H2-H6)
5	3,7	$-\text{CH}-$	
6	3,8	$-\text{CH}$	
7	4,8	HOD	Água
8	5,2	$-\text{CHO}$	Amido (H1) + PHS
9	6,9	$-\text{NH}_2$	Proteína (H cadeia lateral)
10	7,1	$-\text{NH}_2$	
11	7,5	$-\text{NH}_2$	
12	8,2	$-\text{NH}$	Proteína (H cadeia central)

^a (§ IV.3.2.2, Tabela 4.2)

^b (§ VI.3.3.2.2, Tabela 6.5)

Comparando o espectro da amostra de glúten+amido (Figura 7.14b) com a amostra de glúten (Figura 7.14a), é possível verificar que a adição de amido ao sistema de glúten se reflectiu num espectro sobreposto sobre um componente largo, o qual se deverá à diminuição da mobilidade da água no sistema, tal como será confirmado pela variação dos valores de T_{1H} e T_{2H} , mais à frente ao longo deste capítulo. Esta diminuição da mobilidade da água deverá estar relacionada como o aprisionamento da água nos grânulos de amido,

os quais, uma vez em contacto com a água, absorvem a água aumentando sensivelmente de tamanho.

A presença de amido na amostra glúten+amido conduziu ainda à melhor definição dos sinais característicos da contribuição do amido, nomeadamente na região de 3,3-3,9 ppm. Os sinais característicos da contribuição das proteínas encontram-se menos intensos o que se deve quer à menor quantidade relativa de glúten na amostra, quer à presença do componente largo sobre o qual se sobrepõe o espectro.

A adição de PHS ao sistema glúten+amido (amostra glúten+amido +PHS) conduziu a uma diminuição do componente largo do espectro, observando-se ainda uma melhor resolução dos sinais derivados do amido (3,5-3,8 ppm e 5,2 ppm).

Como resultado da variação de mobilidade da água entre os três sistemas, o sinal da água apresentou diferentes valores de largura a meia altura, registando-se os valores de 32 Hz, 63 Hz e 47 Hz, respectivamente para as amostras de glúten, glúten+amido e glúten+amido +PHS.

VII. 3.2.2.2. Efeito do tratamento térmico 20- 80 - 20°C

O comportamento dos sistemas glúten+amido e glúten+amido+PHS durante o ciclo de aquecimento/arrefecimento foi igualmente analisado através da aquisição de espectros de ^1H -MAS a várias temperaturas, numa gama de 20-80-20°C. Estes espectros estão apresentados na Figura 7.15. No lado esquerdo da figura é apresentado o conjunto dos espectros do sistema glúten+amido e no lado direito é apresentado o conjunto dos espectros do sistema glúten+amido +PHS.

Ambas as amostras glúten+amido e glúten+amido +PHS apresentaram um comportamento bastante diferente entre si ao longo de todo o tratamento térmico. Para as amostras sem PHS (amostra glúten+amido) observa-se que o aquecimento até 60°C promoveu uma melhoria da resolução a qual foi perdida com o aumento da temperatura até 80°C. Após o arrefecimento desta amostra de novo até aos 20°C, verificou-se a perda quase total do sinal para todos os componentes, permanecendo apenas o sinal HOD, o que aponta para a formação irreversível de um sistema rígido e amorfo, por acção do aquecimento e posterior

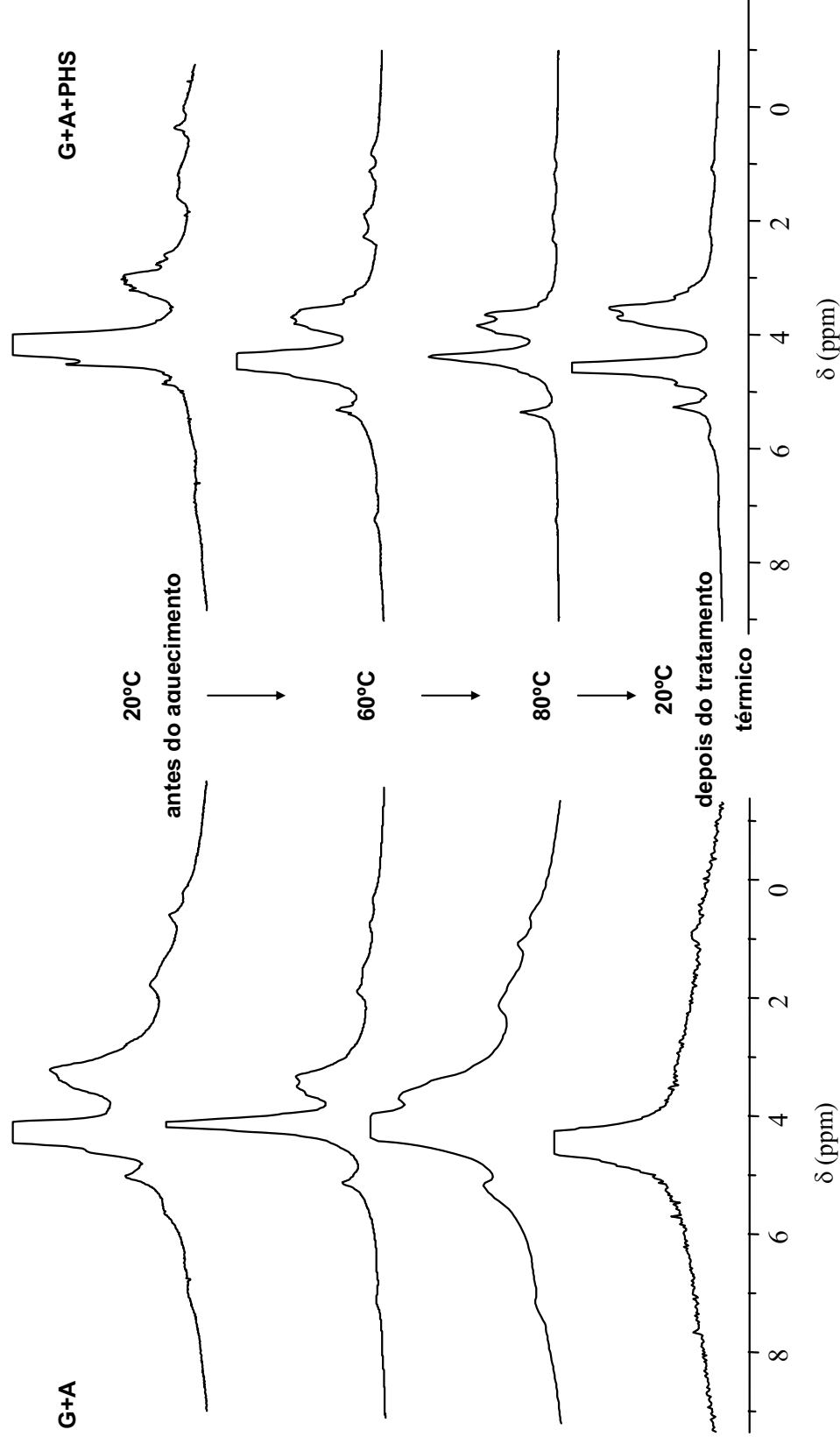


Figura 7.15 - Comportamento das amostras glúten+amido (10% glúten + 90% amido) e glúten+amido +PHS (10% glúten + 89% amido+1% PHS) (50% D₂O m/m) ao longo do ciclo de aquecimento (20-80°C) e arrefecimento (80-20°C); todos os espectros adquiridos a 10kHz, espectros glúten+amido: ns=164 , espectros glúten+amido +PHS: ns= 1008

arrefecimento. Estes resultados são confirmados pela descida dos valores de T_{2H} tal como será discutido posteriormente.

Na presença de 0,5% de PHS (amostra glúten+amido+PHS), a resolução dos espectros é mantida até ao final do ciclo de aquecimento/arrefecimento. Com o aquecimento observou-se uma melhoria da resolução de todo o espectro, sobretudo das ressonâncias alifáticas (0-3 ppm) e das ressonâncias derivadas do amido (3-4 ppm, 5,3 ppm), observando-se igualmente o aumento da intensidade de todos os sinais do espectro. Com o arrefecimento, a intensidade dos sinais diminuiu como resultado de uma diminuição da mobilidade.

O espectro registado após o arrefecimento apresentou um perfil semelhante ao espectro registado antes do aquecimento mas, contudo, a recuperação do perfil inicial não foi total. Este resultado foi igualmente observado no comportamento das amostras de amido + 0,5 % PHS, tal como discutido no capítulo 6. Ao nível molecular, a presença da fracção de PHS na amostra constituída por glúten e amido parece ter-se revelado bastante importante, uma vez que contribuiu para a manutenção da mobilidade na amostra, o que é igualmente confirmado pelos valores de T_{1H} e T_{2H} . Este resultado deverá estar relacionado com a capacidade de absorção de água pelas PHS. Foi anteriormente observado através dos estudos de reologia discutidos em § VI.3.1.3, que a presença de PHS contribuiu para a diminuição da extensão da retrogradação. O aprisionamento de água pelas PHS permite a manutenção de um estado de hidratação durante um certo tempo, pelo que os componentes vizinhos tais como cadeias de amilose e amilopectina se mantêm hidratados durante um período de tempo mais longo.

O comportamento aqui observado para o sistema glúten+amido apresentou-se bastante diferente do comportamento observado para a farinha (§ III.3.2.3), ao longo do tratamento térmico. Já a amostra glúten+amido+PHS apresentou uma maior aproximação do comportamento da farinha, mostrando assim que as PHS apresentam um papel activo na manutenção de um sistema mais hidratado ao longo do cozimento das massas de farinha.

VII. 3.2.3. Tempos de Relaxação T_{1H} e T_{2H}

A caracterização ao nível molecular das amostras reconstituídas glúten+amido e glúten+amido+PHS da variedade SOR foi complementada com a medição dos tempos de relaxação longitudinal (T_{1H}) e de relaxação transversal (T_{2H}).

VII. 3.2.3.1. Efeito da adição de PHS

No sentido de analisar o efeito da adição das PHS nas amostras reconstituídas, os valores de T_{1H} e T_{2H} dos principais sinais das amostras de glúten, glúten+amido e glúten+amido+PHS foram primeiramente comparados entre si, à temperatura ambiente, procurando-se deste modo encontrar aspectos diferenciadores da dinâmica molecular em cada um dos sistemas. As Tabelas 7.4 e 7.5 apresentam, respectivamente, os valores de T_{1H} e T_{2H} registados para as amostras de glúten, glúten+amido (10% glúten + 90% amido) e glúten+amido+PHS (10% glúten + 89% amido + 1% PHS) da variedade SOR, hidratadas a 50% D_2O (m/m), à temperatura ambiente (20°C, antes do tratamento térmico). Os valores de T_{1H} e T_{2H} da amostra de glúten, anteriormente discutidos no capítulo IV, são novamente apresentados de modo a facilitar a comparação dos resultados.

Por comparação dos valores da Tabela 7.4, verifica-se que as três amostras apresentaram valores de T_{1H} um pouco diferentes.

Na amostra de glúten, todos os componentes apresentaram valores de T_{1H} relativamente próximos entre si, indicando uma certa proximidade entre os componentes. A água apresentou um valor ligeiramente inferior aos dos restantes componentes, apresentando-se no entanto mais próxima dos prótons de cadeias laterais (2,2-3,8 ppm) do que dos prótons intervenientes nas ligações peptídicas (6,9-7,5 ppm).

A adição de amido ao glúten (amostra glúten+amido - 10% glúten + 90% amido) conduziu a um aumento de todos os valores de T_{1H} , comparativamente à amostra de glúten isolado. A observação de uma diminuição generalizada dos valores de T_{2H} para a amostra reconstituída glúten+amido, como será discutido mais tarde, parece indicar que a adição de amido ao glúten contribuiu para a formação de uma matriz mais rígida comparativamente à amostra de glúten. Para os prótons metílicos, porém, a subida do valor de T_{1H} parece

indicar um aumento da mobilidade (tal como confirmado pelos valores de T_{2H}) para estes componentes, o que poderá ser devido à presença de lípidos residuais presentes no amido.

Tabela 7.4 - Valores dos tempos de relaxação longitudinal - T_{1H} - para as amostras de de glúten, glúten+amido (10% glúten + 90% amido) e glúten+amido+PHS (10% glúten + 89% amido + 1% PHS) da variedade Sorraia, hidratadas a 50% D_2O (m/m), à temperatura ambiente (20°C antes do aquecimento)

δ ppm	Atribuição	T_{1H} (s)		
		Glúten	Glúten+Amido	Glúten+Amido +PHS
1,1	- CH_3 Lípidos residuais + proteína	$0,774 \pm 0,007$	$1,19 \pm 0,14$	$1,64 \pm 0,16$
2,2	- CH_2 - Proteína + lípidos residuais	$0,649 \pm 0,005$	$0,943 \pm 0,125$	$0,659 \pm 0,063$
3,8	-CH Proteína (região alfa) + Amido (H2-H6)	$0,646 \pm 0,022$	$1,62 \pm 0,12$	$0,964 \pm 0,065$
4,8	HOD Água	$0,592 \pm 0,009$	$1,82 \pm 0,03$	$2,02 \pm 0,02$
5,2	-CHO Amido (H1) + PHS	n.d.	$1,60 \pm 0,09$	$1,71 \pm 0,04$
6,9	- NH_2 Proteína (H cadeia lateral)	$0,776 \pm 0,018$	$1,38 \pm 0,52$	$0,978 \pm 0,040$
7,3		$0,743 \pm 0,018$	N.D.	$0,924 \pm 0,041$
7,5		$0,782 \pm 0,019$	N.D.	$0,896 \pm 0,034$

n.d. - não detectável; N.D. - não determinável

Na amostra glúten+amido, a água apresentou um valor de T_{1H} mais elevado do que o valor de T_{1H} da água no glúten, o que sugere uma maior imobilização da água por efeito da adição de amido. A água e o amido apresentaram valores de T_{1H} relativamente próximos, dada a gama de incerteza associada, indicando que estes dois componentes se encontram próximos entre si, dada a eficiência de difusão de spin. A maior imobilização da água observada para esta amostra, bem como a sua maior proximidade para com o amido, deverá estar relacionada com a absorção da água pelos grânulos de amido.

Tabela 7.5 - Valores dos tempos de relaxação transversal - T_{2H} - para as amostras de de glúten, glúten+amido (10% glúten + 90% amido) e glúten+amido+PHS (10% glúten + 89% amido + 1% PHS) da variedade Sorraia, hidratadas a 50% D₂O (m/m), à temperatura ambiente (20°C antes do aquecimento)

δ ppm	Atribuição	T_{2H} (ms)								
		Glúten			Glúten+Amido			Glúten+Amido+PHS		
		T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% protões móveis (T_{2B})	T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% protões móveis (T_{2B})	T_{2A} / ms	T_{2B} /ms	% protões móveis (T_{2B})
1,1	Lípidos residuais + proteína (H alifáticos)	0.524 ± 0.112	4.62 ± 0.79	47	0.147 ± 0.017	12.8 ± 1.8	27	0.062 ± 0.010	6.43 ± 1.18	38
2,2	Proteína + lípidos residuais (H alifáticos)	0.639 ± 0.191	4.04 ± 0.85	52	0.095 ± 0.026	1.54 ± 0.75	66	0.011 ± 0.031	3.01 ± 0.28	-
3,8	Proteína (H região alfa) + Amido (H2-H6)	0.534 ± 0.184	4.34 ± 0.96	53	0.149 ± 0.025	2.69 ± 0.57	31	0.021 ± 0.077	8.47 ± 1.42	-
4,8	HOD	1.94 ± 0.53	5.16 ± 0.85	78	-	6.94 ± 0.63	-	-	8.94 ± 0.52	-
5,2	Amido (H1) + PHS	n.d			0.171 ± 0.024	3.25 ± 0.56	34	-	3.16 ± 0.40	-
6,9	Proteína (NH ₂ cadeia lateral)	0.398 ± 0.131	4.45 ± 0.60	13	0.085 ± 0.051	0.346 ± 0.082	57	0.737 ± 0.062	-	-
7,3		0.676 ± 0.123	3.97 ± 0.56	51	0.123 ± 0.022	0.899 ± 0.303	27	0.737 ± 0.057	-	-
7,5		0.765 ± 0.135	6.51 ± 1.05	48	N.D.			1.28 ± 0.150	-	-

n.d. - não detectável; N.D. - não determinável

A adição de PHS à amostra constituída por glúten e amido (amostra glúten+amido +PHS) conduziu a alguma variação dos valores de T_{1H} . O valor de T_{1H} dos prótons metílicos (1,1 ppm) aumentou relativamente à amostra glúten+amido, sugerindo uma maior imobilização. Os prótons do amido H2-H6 (3,8 ppm) registaram também uma diminuição dos valores de T_{1H} , o que parece indicar um aumento da mobilidade destes prótons, tal como confirmado pela subida dos valores de T_{2H} (Tabela 7.5).

Com a adição de PHS à amostra glúten+amido, o valor de T_{1H} da água aumentou observando-se uma separação dos prótons HOD relativamente aos prótons amídicos. A subida do valor de T_{2H} observado para a água na amostra glúten+amido+PHS sugere que os valores de T_{1H} da água se encontram do lado esquerdo da curva de T_1 (do lado dos tempos de correlação mais curtos) o que indica que a água se encontra essencialmente no seu estado livre, e portanto a sua mobilidade terá aumentado por efeito da adição das PHS. É também verificada uma maior mobilidade da água na amostra glúten+amido+PHS comparativamente à água na amostra de glúten.

A adição de PHS parece também ter contribuído para o acréscimo da mobilização dos prótons proteicos. Os valores de T_{1H} do glúten bem como os valores de T_{2H} registados para os prótons $-NH_2$ foram todos mais elevados do que os registados para o glúten. A comparação destes valores com os da amostra glúten+amido é difícil dado que para esta última amostra não foi possível determinar valores de T_{1H} . Ao nível da proteína, a adição de PHS conduziu à formação de uma matriz mais homogénea, tendo apresentado apenas um valor de T_{2H} como indicação de um ambiente único de mobilidade em toda a proteína.

VII. 3.2.3.2. Efeito do tratamento térmico

O comportamento das amostras reconstituídas ao longo do tratamento térmico foi também acompanhado através dos tempos de relaxação T_{1H} e T_{2H} . Nesta secção serão primeiramente discutidos os resultados relativos à amostra glúten+amido e posteriormente os resultados relativos à amostra glúten+amido +PHS. Os valores de T_{1H} e T_{2H} registados à temperatura ambiente são novamente apresentados em todas as tabelas, de modo a facilitar a comparação dos resultados.

Os valores de T_{1H} e T_{2H} da amostra glúten+amido (10% glúten + 90 % amido) estão apresentados respectivamente nas Tabelas 7.6 e 7.7 O aquecimento da amostra glúten+amido até 80°C conduziu a um aumento generalizado dos valores de T_{1H} , o qual deverá ser interpretado como o reflexo da diminuição da mobilidade.

Tabela 7.6 - Valores dos tempos de relaxação longitudinal - T_{1H} - para a amostra glúten+amido (10% glúten + 90% amido) da variedade Sorraia, hidratada a 50% D₂O (m/m), às temperaturas 20°C (antes do tratamento térmico), 80°C e 20°C (depois do tratamento térmico)

δ (ppm)	Atribuição	Temperaturas (°C)		
		20°C antes do tratamento térmico	80°C	20°C depois do tratamento térmico
1,1	- CH ₃ Lípidos residuais + proteína	1,19 ± 0,14	1,02 ± 0,07	-
2,2	- CH ₂ - Proteína + lípidos residuais	0,943 ± 0,125	0,896 ± 0,224	-
3,5	-CH Proteína (região alfa) + Amido (H2-H6)	1,71 ± 0,10	2,88 ± 0,64	-
3,7		1,67 ± 0,12	3,45 ± 0,66	-
3,8		1,62 ± 0,12	3,35 ± 0,55	-
4,8	água	1,82 ± 0,03	2,63 ± 0,13	0,890 ± 0,080
5,2	-CHO Amido (H1)	1,60 ± 0,09	2,04 ± 0,14	-
6,9	- NH ₂ Proteína (H cadeia lateral)	1,38 ± 0,52	2,11 ± 0,21	-
7,1		N.D.	2,12 ± 0,39	-
8,2		N.D.	5,07 ± 1,90	-

N.D.- não determinável

Tabela 7.7 - Valores dos tempos de relaxação transversal - T_{2H} - para a amostra glúten+amido (10% glúten + 90% amido) da variedade Sorraia, hidratada a 50% D_2O (m/m), às temperaturas 20°C (antes do tratamento térmico), 80°C e 20°C (depois do tratamento térmico)

δ ppm	Atribuição	20°C antes do tratamento térmico			80°C			20°C depois do tratamento térmico		
		T_{2A} /ms	T_{2B} /ms	% próteas móveis (T_{2B})	T_{2A} /ms	T_{2B} /ms	% próteas móveis (T_{2B})	T_{2A} /ms	T_{2B} /ms	% próteas móveis (T_{2B})
1,1	- CH_3 Lípidos residuais + proteína	$0,147 \pm 0,017$	$12,8 \pm 1,8$	27	$0,106 \pm 0,013$	$10,5 \pm 1,1$	30	-	-	-
2,2	- CH_2 - Proteína + lípidos residuais	$0,095 \pm 0,026$	$1,54 \pm 0,75$	66	$0,078 \pm 0,010$	$0,834 \pm 0,275$	16	-	-	-
3,3	-CH	$0,138 \pm 0,029$	$3,58 \pm 0,78$	34	$0,100 \pm 0,010$	$1,73 \pm 0,35$	21	-	-	-
3,5	Proteína (região alfa)	$0,153 \pm 0,024$	$2,86 \pm 0,61$	33	$0,082 \pm 0,010$	$0,955 \pm 0,180$	30	-	-	-
3,8	+ Amido (H2-H6)	$0,149 \pm 0,025$	$2,69 \pm 0,57$	31	-	-	-	-	-	-
4,8	água	$6,94 \pm 0,63$	-	-	$0,116 \pm 0,041$	$1,83 \pm 0,23$	63	$0,033 \pm 0,009$	$1,13 \pm 0,06$	70
5,2	-CHO Amido (H1)	$0,171 \pm 0,024$	$3,25 \pm 0,56$	34	$0,164 \pm 0,012$	-	-	-	-	-
6,5	- NH_2	$0,085 \pm 0,051$	$0,346 \pm 0,082$	57	-	-	-	-	-	-
7,1	Proteína	$0,123 \pm 0,022$	$0,899 \pm 0,303$	27	$0,112 \pm 0,022$	-	-	-	-	-
8,2	(H cadeia lateral)	$0,159 \pm 0,018$	-	10	$0,108 \pm 0,026$	-	-	-	-	-

Os valores de T_{2H} apresentados na Tabela 7.6 para a amostra glúten+amido confirmam o enrijecimento de todos os componentes por efeito do aquecimento até 80°C. A diminuição da mobilidade desta amostra devido ao aquecimento foi igualmente observada na perda de resolução do espectro glúten+amido registado a 80°C (Figura 7.17).

Após o arrefecimento desta amostra, a perda do sinal foi quase total no espectro 1H -MAS desta amostra, tendo-se conseguido determinar os valores de T_{1H} e de T_{2H} apenas para a água, o único sinal visível no espectro. A água apresentou um valor de T_{1H} bastante mais baixo do que o valor registado à mesma temperatura antes do aquecimento. A diminuição do valor de T_{2H} observada igualmente para esta amostra sugere um grande aumento da rigidez da água na amostra. Apesar de se ter formado uma matriz uniformemente rígida, a água apresentou um comportamento bi-exponencial, apresentando dois valores de T_{2H} . O T_{2H} mais curto (T_{2A}) corresponde à fracção de protões que se encontram mais rígidos na amostra, provavelmente associados ao amido ou à proteína. O T_{2H} mais longo (T_{2B}) corresponde à fracção de protões que se encontram mais móveis na amostra, os quais se terão libertado das cadeias de amilose e amilopectina que terão passado de um estado mais amorfo para um estado mais cristalino, sofrendo a retrogradação.

O comportamento da amostra glúten+amido aqui observado não era esperado, tendo em conta as amostras de farinha bem como as amostras isoladas de glúten e amido apresentaram um comportamento contrário. A presença de uma grande quantidade de amido na amostra de glúten deverá ter contribuído para uma menor quantidade de água disponível para a hidratação do glúten, pelo que, durante o aquecimento o glúten deverá ter sofrido uma grande alteração ao nível estrutural, desnaturando. A desnaturação da matriz proteica terá condicionado a mobilidade de todo o sistema, permanecendo a água apenas como o único componente mais móvel. Os resultados obtidos na caracterização reológica de amostras com a mesma constituição mostraram uma subida dos valores de G' após o tratamento térmico até 80°C, indicando um reforçamento da estrutura da amostra.

Os valores de T_{1H} e T_{2H} da amostra glúten+amido+PHS (10% glúten + 89 % amido + 1 % PHS) estão apresentados nas Tabelas 7.8 e 7.9 respectivamente. Durante o tratamento térmico, a amostra glúten+amido+PHS apresentou um comportamento diferente do da amostra glúten+amido. A adição de PHS claramente contribuiu para a manutenção de um sistema móvel ao longo de todo o tratamento térmico. Contrariamente ao observado para a

amostra glúten+amido, o aquecimento da amostra glúten+amido+PHS até 80°C promoveu um aumento da mobilidade na amostra em geral, tal como evidenciado pela subida dos valores de T_{1H} e de T_{2H} da maioria dos componentes. A água, porém, apresentou uma diminuição dos tempos de relaxação, sugerindo uma maior imobilização por efeito do aquecimento, um efeito igualmente observado na amostra G+A para a mesma temperatura.

Tabela 7.8 - Valores dos tempos de relaxação longitudinal - T_{1H} - para a amostra glúten+amido +PHS (10% glúten + 89% amido + 1% PHS) da variedade Sorraia, hidratada a 50% D₂O (m/m), às temperaturas 20°C (antes do tratamento térmico), 80°C e 20°C (depois do tratamento térmico)

δ ppm	Atribuição	Temperaturas (°C)		
		20°C antes do tratamento térmico	80°C	20°C depois do tratamento térmico
1,2	- CH ₃ Lípidos residuais + proteína	1,64 ± 0,16	1,80 ± 0,08	1,24 ± 0,04
2,1	- CH ₂ - Proteína + lípidos residuais	0,659 ± 0,063	0,811 ± 0,041	-
2,4		0,721 ± 0,043	0,754 ± 0,046	0,691 ± 0,114
3,4	-CH Proteína (região alfa) + Amido (H2-H6)	1,23 ± 0,71	1,30 ± 0,02	1,33 ± 0,05
3,7		1,06 ± 0,08	1,31 ± 0,02	1,44 ± 0,06
4,0		0,964 ± 0,065	1,13 ± 0,05	1,38 ± 0,07
4,8	HOD água	2,02 ± 0,02	1,60 ± 0,03	1,60 ± 0,06
5,2	-CHO Amido (H1) + PHS	1,71 ± 0,04	1,28 ± 0,04	1,73 ± 0,19
6,9	- NH ₂ Proteína (H cadeia lateral)	0,978 ± 0,040	-	1,40 ± 0,45
7,2		0,924 ± 0,041	1,23 ± 0,19	-
7,5		0,896 ± 0,034	-	0,527 ± 0,116

Tabela 7.9 - Valores dos tempos de relaxação transversal - T_{2H} - para a amostra glúten+amido+PHS (10% glúten + 89% amido + 1% PHS) da variedade Sorraia, hidratada a 50% D₂O (m/m), às temperaturas 20°C (antes do tratamento térmico), 80°C e 20°C (depois do tratamento térmico) (N.D. - não determinável)

δ ppm	Atribuição	20°C - antes do tratamento térmico			80°C			20°C - depois do tratamento térmico		
		T_{2A} /ms	T_{2B} /ms	% prótons móveis (T_{2B})	T_{2A} /ms	T_{2B} /ms	% prótons móveis (T_{2B})	T_{2A} /ms	T_{2B} /ms	% prótons móveis (T_{2B})
1,2	- CH ₃ Lípidos residuais + proteína	0,062 ± 0,010	6,43 ± 1,18	38	0,081 ± 0,023	12,4 ± 1,4	42	0,101 ± 0,020	3,56 ± 1,18	<1
2,1	- CH ₂ - Proteína + lípidos residuais	0,011 ± 0,031	3,01 ± 0,28	<1	0,136 ± 0,024	4,87 ± 0,38	53	-	-	-
2,4		0,012 ± 0,404	4,38 ± 0,68	<1	0,084 ± 0,031	8,47 ± 0,65	56	0,107 ± 0,020	0,610 ± 0,175	28
3,4	-CH Proteína (região alfa) + Amido (H2-H6)	0,014 ± 0,161	4,38 ± 0,67	<1	0,122 ± 0,013	10,7 ± 1,4	23	0,148 ± 0,014	7,32 ± 0,64	27
3,7		0,021 ± 0,071	7,82 ± 1,06	2	0,166 ± 0,041	8,99 ± 0,75	57	0,232 ± 0,022	7,30 ± 0,58	37
4,0		0,021 ± 0,077	8,47 ± 1,42	1	0,172 ± 0,046	7,58 ± 0,55	94	0,318 ± 0,085	6,68 ± 1,78	36
4,8	HOD - água	-	8,94 ± 0,52	-	0,093 ± 0,033	2,12 ± 0,11	76	0,102 ± 0,044	6,73 ± 0,37	70
5,1	-CHO Amido (H1)	-	3,16 ± 0,40	-	0,162 ± 0,027	18,9 ± 0,7	64	0,064 ± 0,035	2,68 ± 0,51	55
6,9		0,737 ± 0,057	-	-	N.D.	-	-	0,187 ± 0,047	-	-
7,2	- NH ₂ Proteína	1,28 ± 0,150	-	-		3,83 ± 1,16	-	0,193 ± 0,048	-	-
7,5	(H cadeia lateral)	0,011 ± 0,034	3,19 ± 0,55	-	N.D.	-	-	N.D.	-	-
8,2		-	-	-		1,56 ± 0,16	-	N.D.	-	-

Após o arrefecimento da amostra glúten+amido+PHS, verifica-se ainda a existência de alguma mobilidade na amostra, confirmando a observação de sinais com uma significativa intensidade no espectro ^1H -MAS registado após o tratamento térmico. Os valores de $T_{1\text{H}}$ derivados do amido foram todos superiores aos valores registados inicialmente, antes do tratamento do térmico, e os respectivos valores de $T_{2\text{H}}$ subiram ou não variaram significativamente, indicando que estes protões se encontram ainda consideravelmente móveis. Os protões do amido continuaram a apresentar um comportamento bi-exponencial. No entanto, a percentagem de protões da fracção móvel encontra-se abaixo dos 40%, o que parece sugerir que o amido, apesar de apresentar alguma mobilidade, apresenta já algum grau de cristalinidade.

A proteína apresentou um comportamento diferente do amido, apresentando uma tendência para uma maior imobilização. Os valores de $T_{2\text{H}}$ dos protões amídicos diminuíram, indicando que estes terão iniciado o processo de desnaturação.

Comparativamente ao valor registado antes do aquecimento, a água apresentou um valor de $T_{1\text{H}}$ mais baixo, por sua vez igual ao valor registado a 80°C. Os valores de $T_{2\text{H}}$ mostram que, após o tratamento térmico, a água recuperou alguma da sua mobilidade inicial, tendo apresentado um valor de $T_{2\text{H}}$ próximo do valor registado antes do aquecimento. Após o arrefecimento a água apresentou um comportamento bi-exponencial do $T_{2\text{H}}$, apresentando uma elevada percentagem de protões móveis (70%). Porém, a apresentação dois valores de $T_{2\text{H}}$ de reflecte alguma diminuição da mobilidade da água na amostra relativamente ao estado inicial, estando uma parte da população dos protões da água (30%) ainda imobilizada, provavelmente ligada às PHS. O valor de $T_{2\text{b}}$ da água foi semelhante aos valores de $T_{2\text{b}}$ dos protões H2-H6, o que indica mobilidades de magnitude comparável entre protões da água e do amido.

VII. 4. Conclusões

Neste capítulo foi apresentado um estudo preliminar sobre o efeito das PHS em amostras reconstituídas, compostas por amido e glúten.

Na análise dos sistemas constituídos apenas por amido e glúten, verificou-se que uma maior quantidade de glúten se reflectiu na exibição de valores mais elevados do módulo de

conservação, sendo a matriz proteica o principal responsável pelo comportamento reológico observado. Apesar do efeito dominante do glúten observado ao nível reológico à temperatura ambiente, ao nível molecular, porém, os espectros de RMN de ^{13}C -CP/MAS e de ^1H -MAS foram dominados essencialmente pelo amido, o constituinte presente em maior quantidade. Comparativamente à amostra de glúten isolado, a presença de amido contribuiu para a formação de uma matriz mais rígida, bem como para uma maior imobilização da água tal como revelado pelos tempos de relaxação.

Durante o tratamento térmico 20-80-20°C, os sistemas glúten+amido apresentaram um perfil reológico bastante idêntico ao perfil apresentado pelas amostras de amido isolado, tendo o comportamento reológico ao longo do aquecimento sido dominado essencialmente pelo amido. A presença de uma maior quantidade de glúten nestas amostras conduziu à diminuição da temperatura de gelatinização do amido bem como do valor máximo de G' atingido durante o aquecimento. Durante o arrefecimento foi possível verificar o efeito da presença do glúten, observando-se uma subida bastante mais acentuada do G' relativamente ao anteriormente observado para as amostras de amido isolado. Este efeito terá como possível contribuição o processo de desnaturação da matriz proteica a qual se reflecte em valores de G' mais elevados, tal como anteriormente verificado para as amostras de glúten isolado. Ao nível molecular, o efeito da desnaturação proteica reflectiu-se na drástica perda de resolução da quase totalidade dos sinais no espectro de protão, o que se traduziu num aumento bastante acentuado da rigidez em toda a amostra. O processo de desnaturação da matriz proteica terá iniciado aos 80°C tal como indicado pelos tempos de relaxação registado a esta temperatura. Após o tratamento térmico, a água foi o único componente visível no espectro de ^1H -MAS, apresentando-se bastante mais rígida comparativamente ao estado inicial e à amostra de glúten isolado submetida a igual tratamento térmico.

A adição de PHS às amostras glúten+amido originou um efeito complexo, dependente da quantidade de PHS adicionada. O efeito foi positivo para o desenvolvimento da matriz macromolecular para baixas quantidades de PHS, verificando-se um aumento do seu carácter elástico. Para quantidades mais elevadas de PHS, o efeito inverteu-se observando-se o aumento do carácter viscoso dos sistemas. A manifestação do carácter mais viscoso deverá estar relacionado com maior mobilização da amostra ao nível molecular, o que foi

confirmado pelo aumento de ruído dos espectros de ^{13}C -CP/MAS e pela variação dos tempos de relaxação.

Para uma concentração de glúten constante, o aumento da concentração de PHS conduziu a um aumento da temperatura de gelatinização, diminuição do $G'_{\text{máx}}$ e deslocação da temperatura à qual se atingiu o $G'_{\text{máx}}$ para valores superiores. Este efeito foi semelhante ao observado anteriormente para as misturas de amido+PHS, sugerindo que na mistura glúten+amido+PHS as PHS afectam sobretudo o comportamento reológico do amido, não se evidenciando o efeito das PHS sobre a matriz proteica. Após o tratamento térmico, as PHS contribuem para a manifestação de um carácter mais viscoso, numa extensão dependente da concentração de PHS presente.

Para uma concentração de PHS constante, a diminuição da razão amido: glúten reflectiu-se no aumento do carácter elástico devido a uma maior concentração de glúten. A variação da razão amido: glúten não afectou a temperatura de gelatinização do amido, observando-se apenas uma diminuição do valor de $G'_{\text{máx}}$ para os sistemas com menor quantidade de amido.

Para todos os sistemas glúten+amido+PHS, observou-se uma subida dos valores de G' e diminuição dos valores de $\tan \delta$ após o tratamento térmico, indicando um reforçamento da estrutura dos sistemas, o qual se deverá à gelatinização do amido e ao efeito da desnaturação proteica. Ao nível molecular, os valores de T_{1H} e T_{2H} mostraram que após o tratamento térmico, as amostras glúten+amido+PHS apresentaram ainda alguma mobilidade, contrariamente ao observado para as amostras glúten+amido. A presença de PHS contribuiu para a manutenção da mobilidade do amido, observando-se uma maior imobilização da matriz proteica provocada pelo processo de desnaturação. A água apresentou um comportamento bi-exponencial, indicando que parte da água se encontra mais imobilizada, estando provavelmente ligada às PHS.

A presença de PHS nas amostras de glúten+amido+PHS mostrou assim ser bastante importante para a manutenção de um sistema mais hidratado ao longo do tratamento térmico. A sua presença em farinhas e formulações destinadas à panificação parece ser bastante importante para a manutenção da frescura, por diminuição da taxa de retrogradação do amido, e consequente aumento do tempo de prateleira do produto final.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSÕES FINAIS E TRABALHO FUTURO



Conclusões Finais e Trabalho futuro

Nesta tese caracterizaram-se farinhas de trigo e respectivas fracções de glúten e amido, e apresentou-se o estudo sobre o efeito das pentosanas hidrossolúveis no comportamento destas fracções, ao nível da dinâmica molecular e estrutural, através da aplicação de técnicas de reologia e de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de sólidos. A combinação dos estudos de reologia fundamental com os estudos de espectroscopia de RMN permitiu obter e complementar a informação sobre o comportamento ao nível macromolecular, bem como ao nível molecular, dos vários sistemas em estudo.

As amostras de glúten, amido e pentosanas hidrossolúveis utilizadas neste estudo foram provenientes de duas cultivares portuguesas de farinhas de trigo, cv. *Amazonas* e *Sorraia*, caracterizadas por possuírem propriedades tecnológicas diferentes, nomeadamente o grau de dureza, a força de glúten e a capacidade de absorção da água.

Ao nível reológico, a farinha *Sorraia*, considerada uma farinha de carácter duro, apresentou módulos viscoelásticos mais elevados do que a farinha *Amazonas*, considerada uma farinha de carácter mole. A partir da espectroscopia de RMN de ^1H foi possível verificar que as duas variedades de farinha, hidratadas a 50% (m/m), apresentaram uma dinâmica molecular distinta, tal como confirmado a partir do diferente comportamento dos tempos de relaxação T_{2H} , que reflectem a mobilidade do sistema em geral.

A exibição de módulos viscoelásticos mais elevados pela farinha *Sorraia* deverá estar relacionado principalmente com a qualidade do glúten que a constitui. Na caracterização reológica dos glúten constatou-se que a principal diferença no comportamento viscoelástico dos dois glúten foi o carácter viscoso mais acentuado para o glúten *Sorraia*, o que contraria a tendência observada para as farinhas. O estudo por RMN de sólidos revelou uma menor mobilidade das cadeias da proteína no caso do glúten hidratado da variedade *Sorraia*. O comportamento observado ao nível molecular não explica o maior carácter viscoso, associado a uma maior dissipação de energia aquando da solicitação dinâmica, observado ao nível macroscópico para esta variedade.

A adição de PHS às amostras de glúten conduziu a uma alteração do comportamento do glúten não só ao nível reológico como ao nível espectroscópico. A adição de PHS às amostras de glúten contribuiu para a subida dos valores dos módulos de conservação e de

perda, numa extensão dependente da percentagem bem como da origem das PHS adicionadas. As PHS extraídas da variedade *Amazonas* exerceram um efeito mais pronunciado sobre as propriedades viscoelásticas do glúten, à temperatura ambiente, durante e após o aquecimento. A subida do módulo de conservação devido à adição de PHS foi apoiada pela espectroscopia de ^1H . Através da dinâmica de relaxação do próton verificou-se que a adição de PHS conduziu a uma diminuição da mobilidade do sistema, contribuindo para uma maior homogeneidade da amostra. A presença de PHS contribuiu para uma hidratação mais homogénea da matriz proteica e diminuiu as alterações irreversíveis observadas no glúten durante aquecimento, acima de 60°C . A presença de PHS parece ter servido de protecção contra o efeito do aquecimento até 80°C , evitando ou diminuindo o processo de desnaturação caracterizado por uma maior imobilização das proteínas. Este facto foi consolidado pela persistência da mobilidade verificada após o tratamento térmico pelo comportamento dos tempos de relaxação de $T_{1\text{H}}$ e $T_{2\text{H}}$, em que, contrariamente ao observado para o glúten, na amostra de glúten + 0,5%PHS, as proteínas mostraram ainda uma mobilidade evidente, de magnitude comparável à dos hidratos de carbono.

Na caracterização das amostras de amido de cada uma das variedades, verificou-se que as amostras de amido apresentaram diferenças no comportamento ao longo do tratamento térmico, tal como igualmente observado para as farinhas de ambas as variedades. O amido da variedade *Amazonas* apresentou temperaturas de gelatinização e valores máximos de G' mais elevados do que as amostras de amido *Sorraia*, o que deverá estar relacionado com a menor percentagem de amido danificado e com o menor tamanho médio dos grânulos desta amostra, estando de acordo o comportamento observado para as farinhas. Este resultado consegue explicar as temperaturas de gelatinização mais elevadas verificadas para as amostras de farinha da variedade *Amazonas*. Após o tratamento térmico, ambas as variedades de amido apresentaram a predominância evidente do carácter elástico, observando-se valores dos módulos viscoelásticos bastante semelhantes entre as duas variedades.

A adição de PHS aos sistemas de amido conduziu a um aumento das temperaturas de gelatinização e ao aumento do carácter viscoso dos géis formados. O aumento das temperaturas de gelatinização devido à presença de PHS foi confirmado pela calorimetria de varrimento diferencial. O maior carácter viscoso foi confirmado a partir dos resultados

de RMN, os quais mostraram que a adição de PHS ao amido conduziu a um aumento da mobilidade do sistema em geral, tal como confirmado pela diminuição dos valores de T_{1H} e aumento dos valores de T_{2H} . O efeito mais pronunciado foi observado em condições de maior taxa de hidratação e, sobretudo, para as PHS da variedade *Sorraia* originais, o que sugere que as moléculas de PHS, para além de competirem com o amido pela água, podem também interagir com a amilose e a amilopectina prevenindo a reorganização de ambas macromoléculas na rede do gel de amido, retardando assim o processo de retrogradação. Os resultados da dinâmica de relaxação após o tratamento térmico mostram que após o arrefecimento a água e o amido apresentam mobilidade de magnitude comparável, o que sugere que as macromoléculas constituintes do amido se apresentam ainda suficientemente hidratadas, não tendo ainda iniciado o processo de retrogradação. Após a redução do teor em proteínas, as amostras de PHS de ambas as variedades apresentaram um comportamento bastante semelhante, o que sugere que as proteínas residuais presentes nas amostras de PHS podem influenciar o comportamento reológico das PHS bem como a interacção amido-PHS.

Em misturas constituídas por glúten e amido, verificou-se que antes do tratamento térmico, o glúten é o principal componente responsável pelo comportamento reológico observado. Uma maior quantidade de glúten reflectiu-se na exibição de valores mais elevados do módulo de conservação. As misturas da variedade *Sorraia* apresentaram valores dos módulos viscoelásticos mais elevados do que as misturas da variedade *Amazonas*, o que está de acordo com o comportamento reológico observado para as farinhas de cada uma das variedades. Este resultado sugere que o comportamento distinto observado entre as duas variedades de farinha deverá estar relacionado não só com a diferente qualidade do glúten, mas também com o conjunto glúten-amido. Comparativamente à amostra de glúten isolado, a presença de amido contribuiu para a formação de uma matriz mais rígida, bem como para uma maior imobilização da água tal como revelado pelos tempos de relaxação. Durante e após o tratamento térmico, o amido foi o elemento dominante do comportamento reológico nas misturas glúten+amido, o que se reflectiu no aumento dos valores do módulo de conservação e diminuição dos valores da tangente ao ângulo de perda, à semelhança do observado para as amostras de farinha.

A adição de PHS às amostras glúten+amido originou um efeito complexo, dependente da quantidade de PHS adicionada, observando-se um aumento do carácter elástico dos

sistemas para baixas quantidades de PHS adicionadas, e um aumento do carácter viscoso para quantidades de PHS mais elevadas. A espectroscopia de RMN mostrou que a presença de PHS conduziu a uma maior mobilização da amostra ao nível molecular, o que poderá estar relacionado com o carácter viscoso das PHS. Para uma concentração de glúten constante, o aumento da concentração de PHS conduziu a um aumento da temperatura de gelatinização, diminuição do $G'_{\text{máx}}$ e deslocação da temperatura à qual se atingiu o $G'_{\text{máx}}$ para valores superiores. Este efeito foi semelhante ao observado anteriormente para as misturas de amido+PHS, sugerindo que na mistura glúten+amido+PHS as PHS afectam sobretudo o comportamento reológico do amido, não se evidenciando o efeito das PHS sobre a matriz proteica. Para uma concentração de PHS constante, a diminuição da razão amido: glúten reflectiu-se no aumento do carácter elástico devido a uma maior concentração de glúten. A variação da razão amido:glúten não afectou a temperatura de gelatinização do amido, observando-se uma diminuição do valor de $G'_{\text{máx}}$ para os sistemas com menor quantidade de amido.

Para todos os sistemas glúten+amido+PHS, observou-se uma subida dos valores de G' e diminuição dos valores de $\tan \delta$ após o tratamento térmico, indicando um reforçamento da estrutura dos sistemas, o qual se deverá à gelatinização do amido e ao efeito da desnaturação proteica. Ao nível molecular, os valores de T_{1H} e T_{2H} mostraram que após o tratamento térmico, as amostras glúten+amido+PHS apresentaram ainda alguma mobilidade, contrariamente ao observado para as amostras glúten+amido. A presença de PHS contribuiu para a manutenção da mobilidade do amido, observando-se uma maior imobilização da matriz proteica provocada pelo processo de desnaturação. A água apresentou um comportamento bi-exponencial, indicando que parte da água se encontra mais imobilizada, estando provavelmente ligada às PHS.

Extrapolando o efeito das PHS no comportamento do glúten, do amido e das amostras glúten+amido+PHS, para o comportamento das farinhas de trigo, conclui-se que as pentosanas hidrossolúveis constituem um componente bastante importante para o desenvolvimento de uma massa com uma hidratação mais homogénea, bem como para a manutenção de um sistema mais hidratado ao longo do tratamento térmico. A sua presença em farinhas e formulações destinadas à panificação deverá permitir a manutenção da

frescura, por diminuição da taxa de retrogradação do amido, e consequente aumento do tempo de vida útil do produto final.

O efeito da presença das pentosanas hidrossolúveis na qualidade do produto final deveria ser avaliada num trabalho futuro com ensaios de panificação à escala piloto de modo a assim complementar o estudo agora efectuado do efeito das pentosanas hidrossolúveis nos constituintes principais das farinhas de trigo. Este estudo poderia ser avaliado através de ensaios de análise de textura, complementado por ensaios de RMN de sólidos, uma vez que a conjugação destas duas técnicas provou ter um elevado potencial para um conhecimento mais completo desde o comportamento macromolecular ao comportamento molecular. Este estudo permitiria ainda relacionar o efeito das pentosanas hidrossolúveis com as farinhas de origem, nomeadamente com o diferente grau de dureza, ou ainda avaliar o seu impacto como suplemento de outras farinhas de trigo com diferentes qualidades tecnológicas, ou em diferentes formulações e/ou aplicações na indústria transformadora de cereais.

Porém, previamente a estes ensaios, algum trabalho deverá ainda ser feito de modo complementar os resultados obtidos nesta tese. Apesar da informação valiosa obtida ao nível do RMN sobre o efeito das PHS nos diversos constituintes estudo, mais ensaios deverão ser realizados nesta área, nomeadamente sobre os sistemas reconstituídos e sobre o efeito da purificação das PHS. Verificou-se que a diminuição do teor de proteínas residuais das PHS resultou num comportamento reológico e num efeito semelhante para as PHS de ambas as variedades, bem como numa aproximação dos valores de viscosidade intrínseca das PHS. Que tipo de proteínas constituem a fracção de proteínas residuais das PHS? Qual o efeito específico destas proteínas ao nível molecular dinâmico e estrutural das amostras de amido e de glúten, e como este efeito se reflecte na qualidade do produto final? Apenas algumas questões que ficam em aberto e que se oferecem a estudos futuros.

BIBLIOGRAFIA



- Ablett, S., Barnes, D.J., Davies, A.P., Ingman, S.J., Patient, D.W., 1998. ^{13}C pulse NMR spectroscopy of wheat proteins. *J. Cereal Sci.*, 7:11-20
- Ahmad, F.B., Williams, P.A., 1988. Rheological properties of sago starch. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 4060-4065
- Akuzawa, S., Sawayama, S., Kawabata, A., 1995. Dynamic viscoelasticity and stress relaxation in starch pastes. *J. Texture Stud.*, 26: 489-500
- Alberti, E., 2000. Magnetic Resonance studies of cereal proteins and some solid model systems. PhD Dissertation Thesis, Universidade de Aveiro, Portugal
- Alberti, E., Tatham, A.S., Gilbert, S.M., Gil, A.M., 2000. What can NMR tell about molecular origins of gluten viscoelasticity?. in "*Wheat Gluten*" - P.R. Shewry e A.S. Tatham (Eds), Royal Society of Chemistry, Cambridge UK, pp. 368-371
- Alloncle, M., Doublier, J.L., 1991. Viscoelastic properties of maize starch/hydrocolloid pastes and gels. *Food Hydrocolloid*, 5:455-467
- Alloncle, M., Lefebvre, J., Llamas, G., Doublier, J.L., 1989. A rheological characterization of cereal starch-galactomannan mixtures. *Cereal Chem.*, 66(2): 90-93.
- Amemiya, J.I., Menjivar, J.A., 1992. Comparison of small and large deformation measurements to characterize the rheology of wheat flour doughs. *J. Food Eng.*, 16: 91-108
- American Association of Cereal Chemists – Official Methods of the American Association of Cereal Chemists, 1995, 1997, AACCC, St Paul, Minnesota
- Andrewartha, K. Philips, D.R., Stone, B.A., 1979. Solution properties of wheat-flour arabinoxylans and enzymatically modified arabinoxylans. *Carbohydr. Res.*, 77:191-204
- Annison, G., Choct, M., Cheetam, N.W., 1992. Analysis of wheat arabinoxylans from a large-scale isolation. *Carbohydr. Polym.*, 19:151
- Attenburrow, G., Barnes, D.J., Davies, A.P., Ingman, S.J., 1990. Rheological properties of wheat gluten. *J. Cereal Sci.*, 12:1-14

- Atwell, W.A., Hood, L.F., Lineback, D.R., Marston, E. V., Zobel, H.F., 1988. The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. *Cereal Food World*, 33(3):306-311
- Autio K., 1990. Rheological and microstructural changes of oat and barley starches during heating and cooling, *Food Structure*, 9: 297-304.
- Badiger, M. V., Rajamohanan, P. R., Suryavanshi, P. M., Ganapathy, S., Mashelkar, R. A., 2002. In Situ Rheo-NMR investigations of shear-dependent ^1H spin relaxation in polymer solutions. *Macromolecules*, 35(1):126 - 134
- Baianu, I.C., Forster, H., 1980. Cross-polarization, high-field ^{13}C NMR techniques for studying physicochemical properties of wheat grain, flour, starch, gluten and wheat protein powders. *J. Appl. Biochem.*, 2(5):347-354
- Baker, J.C., Parker, H.K., Mize, M.D., 1943. Pentosans of wheat flour. *Cereal Chem.*, 20:267
- Barlow, K.K., Buttrose, M.S., Simonds, D.H., Vest, M., 1973. The nature of the starch-protein interface in wheat endosperm. *Cereal Chem.* 50: 443-454
- Barnes, H.A., Hutton, J.F., Walters, K., 1989. "*An introduction to rheology*", Elsevier, Amsterdam
- Beasley, H.L., Uthayakumaran, S., Newberry, M., Gras, P.W., Bekes, F., 2000. A fresh look at water: its effect on dough rheology and function. in "*Wheat Gluten*" - P.R. Shewry e A.S. Tatham (Eds), Royal Society of Chemistry, Cambridge UK, pp. 383-386
- Bechtel, D.B., 1985. The microstructure of wheat: Its developments and conversion into bread. *Food Microstruct.*, 4:125-133
- Bechtel, D.B., Zayas, I., Dempster, R., Wilson, J.D., 1993. Size distribution of starch granules isolated from hard red winter and soft red winter wheats. *Cereal Chem.*, 70 (2): 238-240
- Bechtel, D.B., Zayas, I., Kaleikau, L., Pomeranz, Y., 1990. Size-distribution of wheat starch granules during endosperm development. *Cereal Chem.*, 67: 59-63

- Beckwith, A.C., Wall, J.S., 1966. Redusction and reoxidation of the dissulphide bonds in wheat gliadin. *Biochim. Biophys. Acta*, 130:155
- Beckwith, A.C., Wall, J.S., Jordan, R.W., 1965. Reversible reduction and reoxidation of the dissulphide bonds in wheat gliadin. *Arch. Biochim. Biophys.*, 112:16
- Bekes, F., Gras, P.W., Gupta, R.B., 1994. Mixing properties as a measure of reversible reduction/oxidation of doughs. *Cereal Chem.*, 71:44-50
- Belitz, H.-D., Kieffer, R., Seilmeir, W., Wieser, H., 1986. Structure and function of gluten proteins. *Cereal Chem.*, 63 (4): 336-341
- Belton, P.S., 1999. On the elasticity of gluten. *J. Cereal Sci.*, 29:103-107
- Belton, P.S., Colquhoun, I.J., Field, J.M., Grant, A., Shewry, P.R., Tatham, A.S., 1994. ^1H and ^2H NMR relaxation studies of high molecular weight subunit of wheat glutenin and comparison with elastin. *J. Cereal Sci.*, 19:115-121
- Belton, P.S., Colquhoun, I.J., Grant, A., Wellner, N., Field, J.M., Shewry, P.R., Tatham, A.S., 1995. FTIR and NMR studies on the hydration of a high-Mr subunit of glutenin. *Int. J. Biol. Macromol.*, 17:74-80
- Belton, P.S., Duce, S.L., Colquhoun, I.J., 1988b. High-power ^{13}C and ^1H NMR in dry gluten. *Magn. Res. Chem.*, 26:245-251
- Belton, P.S., Duce, S.L., Tatham, A.S., 1987. ^{13}C solution state and solid state NMR of wheat gluten. *Int. J. Biol. Macromol.*, 9:357-362
- Belton, P.S., Duce, S.L., Tatham, A.S., 1988a. Proton nuclear magnetic relaxation studies of dry gluten. *J. Cereal Sci.*, 7: 113-122
- Belton, P.S., Gil, A.M., 1993. Proton nuclear magnetic resonance lineshapes and tranverse relaxation in a hydrated barley protein. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 89(23): 4203-4206
- Belton, P.S., Gil, A.M., 1994. ^1H NMR relaxation time studies of the hydration of the barley protein C-hordein. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 90(8):1099-1103
- Belton, P.S., Grant, A., Sutcliffe, L.H., Gillies, D.G., Wu, X., 1999. Selected spin probes for the electron spin resonance study of the dynamics of water and of lipid in doughs. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 4520-4524

- Belton, P.S., Shewry, P.R., Tatham, A.S., 1985. ^{13}C Solid state nuclear magnetic resonance study of wheat gluten. *J. Cereal Sci.*, 3: 305-317
- Berland, S., Launay, B., 1995. Rheological properties of wheat flour doughs in steady and dynamic shear: Effect of water content and some additives. *Cereal Chem.*, 72: 48-52
- Bernardin, J.E., Kasarda, D.D., 1973. Hydrated protein fibrils from wheat endosperm. *Cereal Chem.*, 50:529-536
- Bettge, A.D., Morris, C.F., 2000. Relationships among grain hardness, end-use quality and pentosan fractions of wheat. *Cereal Chem.*, 77 (2): 241-247
- Bietz, J.A., 1984. Analysis of wheat gluten proteins by high-performance liquid chromatography. *Baker's Dig.*, 58(1):15-21,22
- Biliaderis, C.G., 1983. Differential scanning calorimetry in food research - a review. *Food Chem.*, 10:239-265
- Biliaderis, C.G., 1992. Structures and phase transition of starch in food systems. *Food Technology*, 46(6): 98-109
- Biliaderis, C.G., Izydorczyk, M.S., Lukow, O.M., Bushuk, W., 1992. Pentosans in flours of 1B/1R translocation wheats. *Cereal Chem.*, 69(2): 226-228
- Biliaderis, C.G., Juliano, B.O., 1993. Thermal and mechanical properties of concentrated rice starch gels of varying composition. *Food Chem.* 48:243
- Biliaderis, C.G., Maurice, T.J., Vose, J.R., 1980. Starch gelatinization studied by Differential Scanning Calorimetry. *J. Food Sci.*, 45:1669-1674
- Biliaderis, C.G., Page, C.M., Maurice, T.J., 1986. Non-equilibrium melting of amylose-V complexes: structure property relationships. *Carbohydr. Polym.*, 6:269-288
- Biliaderis, C.G., Tonogai, J. R., 1991. Influence of lipids on the thermal and mechanical properties of concentrated starch gels. *J. Food Sci.*, 39: 833-840
- Björk, I., Nyman, M., Pedersen, B., Siljeström, M., Asp, N.G., Eggum, B.O., 1986. On the Digibility of starch in wheat bread – studies in vitro and in vivo. *J. Cereal Sci.*, 4:1-11
- Blakeney, A.B., Harris, P.J., Henry, R.J., Stone, B.A., 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr Res.*, 113:291-299.

- Bloch, H.A., Darlington, H.F., Shewry, P.R., 2001. In vitro binding of puroindulines to wheat starch granules. *Cereal Chem.*, 78(1):74-78
- Bloksma, A.H., 1975. Thiol and disulfide groups in dough rheology. *Cereal Chem.*, 52: 170
- Bloksma, A.H., 1990. Dough structure, dough rheology, and baking quality. *Cereal Food World*, 35(2):237-244
- Bloksma, A.H., Bushuk, W., 1988. Rheology and chemistry of dough. in *“Wheat chemistry and technology*. 3rd ed., Y. Pomeranz (Ed.), AACC, St Paul, MN, USA, pp. 131-217
- Bohlin, L., Carlson, T.L.G., 1980. Dynamic viscoelastic properties of wheat flour dough: dependence on mixing time. *Cereal Chem.*, 57:175-177
- Branlard, G., Dradvert, M., 1985. Diversity of grain protein and bread quality. II. Correlation between high molecular weight subunits of glutenin and flour quality characteristics. *J. Cereal Sci.*, 3:345-354
- Brites, C.M., Bagulho, A.S., 1999. Seleccção de duas variedades de trigo mole com características tecnológicas distintas. *Deméter – Boletim da Associação de Técnicos de Cereais de Portugal*, 4:4-8
- Brownsey, G.J., Ellis, H.S., Ridout, M.J., Ring, S.G., 1987. Elasticity and failure in composite gels. *J. Rheol.*, 31:635-649
- Bushuk, W., 1966. Distribution of water in dough and bread. *Baker’s Dig.*, 40(5):38-40
- Bushuk, W., 1985. Flour proteins: structure and functionality in dough and bread. *Cereal Food World*, 30(3): 447-451
- Bushuk, W., 1988. Protein-lipid and protein-carbohydrate interactions in flour-water mixtures. in *“Chemistry and physics of baking – materials, processes and products”* J. M. V. Blanshard, P. J. Frazier e T. Galliard (Eds), Royal Society of Chemistry, London, UK, pp. 147-154
- Bushuk, W., 1997. Wheat gluten - more than just bread. *PBI Bulletin*, Sep: 1-23
- Bushuk, W., 1998. Interactions in wheat doughs. in *“Interactions: The Keys to Cereal Quality”*, Rob J. Hamer e R. Carl Hoseney eds, American Association of Cereal Chemists Inc., St Paul, MN, USA

- Caesar, G.V., 1950. The hydrogen bond in starch as a basis for interpreting its behavior and reactivity. in *"Chemistry and Industry of Starch"*, 2nd ed. R.W. Kerr (Ed.), Academic Press, Ins. New York, pp.249-258
- Callaghan, P.T., Gil, A.M., 1999. ^1H NMR spectroscopy of polymers under shear and extensional flow. *Rheol. Acta*, 38:528-536
- Callaghan, P.T., Gil, A.M., 2000. Rhe-NMR of semi-dilute polyacrylamide in water, *Macromolecules*, 33:4116-4124
- Callaghan, P.T., Jolley, K.W., Lelievre, J., Wang, R.B.K., 1983. Nuclear magnetic resonance studies of wheat starch pastes. *J. Colloid Interface Sci.*, 92:332-337
- Campos, D.T., Steffe, J.F., Ng, P.K.W., 1997. Rheological behavior of undeveloped and developed wheat dough. *Cereal Chem.*, 74 (4): 489-494
- Carr, H.Y., Purcell, E.M., 1954. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *Phys. Rev.*, 94:630
- Chakraborty, K., Khan, K., 1988. Biochemical and breadmaking properties of wheat protein components. II. Reconstitution baking studies of protein fractions from various isolation procedures. *Cereal Chem.*, 65:340-344
- Champenois, Y., Rao, M.A., Walker, L. P., 1998. Influence of gluten on the viscoelastic properties of starch-gluten paste and gels. *J. Sci. Food Agric.*, 78:19-126
- Champenois, Y., Rao, M.A., Walker, L.P., 1998b. Influence of alpha-amylase on the viscoelastic properties of starch-gluten pastes and gels. *J. Sci. Food Agric.*, 78:127-133
- Chen, C.H., Bushuk, W., 1970. Nature of proteins in Triticale and its parental species I. Solubility characteristics and amino acid composition of endosperm proteins. *Can. J. Plant Sci.*, 50: 9-14
- Christianson, D.D., Hodge, J.E., Osborne, D., Detroy, R.W., 1981. Gelatinization of wheat starch as modified by xanthan gum, guar gum, and cellulose gum. *Cereal Chem.*, 58(6): 513-517.
- Chung, O.K., Pomeranz, Y., 1981. Recent research on wheat lipids. *Baker's Dig.*, 55(5):38-50, 55,96,97

- Ciaccio, C.F., D'Appolonia, B.L., 1982. Characterisation of pentosans from different wheat flour classes and their gelling capacity. *Cereal Chem.*, 59(2): 96-99
- Clark, A.H., Gidley, M.J., Richardson, R.K., Ross-Murphy, S.B., 1989. Rheological studies of aqueous amylose gels: The effect of chain length and concentration on gel modulus. *Macromolecules*, 22:346-351
- Cocero, A.M., Kokini, J.L., 1991. The study of the glass transition of glutenin using small amplitude oscillatory rheological measurements and differential scanning calorimetry. *J. Rheol.*, 35(2):257-270
- Conde-Petit, B., Escher, F., 1994. Influence of starch-lipid complexation on the ageing behaviour of high concentration starch gels. *Starch/Stärke*, 46 (5): 172-177
- Cornec, M., Popineau, Y., Lefebvre, J., 1994. Characterisation of gluten subfractions by SE-HPLC and dynamic rheological analysis in shear. *J. Cereal Sci.*, 19:131-139
- Courtin, C.M., Delcour, J.A., 1998. Physicochemical and breadmaking properties of low molecular weight wheat derived arabinoxylans. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 4066-4073
- Crowe, N.L., Rasper, V.F., 1988. The ability of chlorine and chlorine related oxidants to induce oxidative gelation in wheat flour pentosans. *J. Cereal Sci.*, 7:283-294
- Cumming, D.B., Tung, M.A., 1977. Modifications of the ultrastructure and rheology of rehydrated commercial wheat gluten. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 10:109-119
- Cuq, B., Boutrort, F., Redl, A., Lullien-Pellerin, V., 2000. Study of the temperature effect on the formation of wheat gluten network: influence on mechanical properties and protein solubility. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2954-2959
- Czuchajowska, Z., Lin, P.-Y., Smolinski, S., 1996. Role in dough of high molecular weight glutenin subunits of soft white winter and club wheats. *Cereal Chem.*, 73(3):338-345
- Czuchajowska, Z., Pomeranz, Y., 1993. Protein concentrates and prime starch from wheat flours, *Cereal Chem.*, 70(6):701-706
- D'Appolonia, B.L., Gilles, K.A., Medcalf, D.G., 1970. Effect of water soluble pentosans on gluten-satrch loaves. *Cereal Chem.*, 70:324-329
- D'Avignon, D.A., Hung, C.-C., Pagel, M.T.L, Hart, B., Bretthorst, G.L., Ackerman, J.J.H., 1990. ^1H and ^2H NMR studies of water in work.free wheat flour doughs. in "NMR

- Applications in Biopolymers*” J.W. Finley, S.J. Shmidt e A.S. Serianni (Eds), Plenum Press, NY, pp.391-414
- D’Ovidio, R., Simeone, M., Masci, S., Porceddu, E., 1997. Molecular characterization of a LMW-GS gene located on chromosome 1B and the development of primers specific for *Glu-B3* complex locus in durum wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 95:1119-1126
- D’Ovidio, R., Simeone, M., Masci, S., Porceddu, E., Kasarda, D.D., 1995. Nucleotide sequence of a γ -type glutenin gene from a durum wheat: Correlation with γ -type glutenin sub-unit from the same biotype. *Cereal Chem.*, 72:443-449
- Dachkevitch, T., Autran, J.C., 1989. Prediction of baking quality of bread wheats in breeding programs by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.*, 66:448-456
- D’Appolonia, B.L., MacArthur, L.A., 1975. Note on a procedure for the isolation of the water insoluble pentosans of wheat flour. *Cereal Chem.*, 52:274
- D’Appolonia, B.L., Rayas-Duarte, P., 1994. Wheat carbohydrates: Structure and functionality. in *"Wheat: production, properties and quality"*, W. Bushuk and V.F. Rasper, eds, Blackie Academic and Professional, Glasgow
- De Gennes PG. 1979. *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Ithaca NY: Cornell University Press. 327 p.
- Dea, I.C.M., Rees, D.A., Beveridge, R.J., Richards, G.N., 1973, Aggregation with change of conformation in solutions of hemicellulose xylans. *Carbohydr. Res.*, 29:363-372
- Delcour, J.A., Rouseu, N., Van Haesdonck, I.P., 1999b. Pilot scale isolation of water extractable arabinoxylans from rye (*Secale cereale L.*). *Cereal Chem.*, 76:1-2
- Delcour, J.A., van Win, H., Grobet, P.J., 1999. Distribution and structural variation of arabinoxylans in common wheat mill streams. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 271-275
- Delcour, J.A., Vanhamel, S., De Geest, C. 1989. Physico-chemical and functional properties of rye non-starch polysaccharides. I. Colorimetric analysis of pentosans and their relative monosaccharide composition in fractionated (milled) rye products. *Cereal Chem.*, 66: 107-111

- Donovan, J.W., 1979. Phase transitions of starch-water systems. *Biopolymers*, 18: 263-275.
- Donzek, B., Bushuk, W., 1968. A note on the formation of free radicals during mixing. *Cereal Chem.*, 45:286
- Doublier, J-L., Choplin, L., 1989. A rheological description of amylose gelation, *Carbohydr. Res.*, 193: 215-226
- Dragsdorf, R.D., Varriano-Marston, E., 1980. Bread staling: X-ray diffraction studies on bread supplemented with α -amylases from different sources *Cereal Chem.*, 57:310-314
- Dreese, P.C., Faubion, J.M., Hoseney, R.C., 1988a. Dynamic rheological properties of flour, gluten and gluten-starch doughs. I. Temperature-dependent changes during heating. *Cereal Chem.*, 65(4):348-353
- Dreese, P.C., Faubion, J.M., Hoseney, R.C., 1988b. Dynamic rheological properties of flour, gluten and gluten-starch doughs. II. Effect of various processing and ingredient changes. *Cereal Chem.*, 65(4):354-359
- Edwards, N.M., Dexter, J.E., Scanlon, M.G., 2001. The use of rheological techniques to elucidate durum wheat dough strength properties. ICHEAP-5 -The 5th italian conference on chemical and process engineering, Florence, Italy, vol.2, pp.825-830
- Edwards, N.M., Dexter, J.E., Scanlon, M.G., Cenkowski, S., 1999. Relationship of creep-recovery and dynamic oscillatory measurements to durum wheat physical dough properties. *Cereal Chem.*, 76 (5): 638-645
- Eliasson, A.-C., 1980. Effect of water content on the gelatinization of wheat starch. *Starch/Stärke*, 35:354
- Eliasson, A.-C., 1985. Starch gelatinization in the presence of emulsifiers - A morphological study of wheat starch. *Starch/Stärke*, 37 (12): 411-415
- Eliasson, A.-C., 1986. Viscoelastic behaviour during Starch Gelatinization. I Comparison of wheat, maize, potato and waxy-barley starches. *J. Texture Stud.* 17:253-265
- Eliasson, A.-C., 1998. Lipid-Carbohydrate interactions, in *"Interactions: The keys to Cereal Quality"*, Rob Hamer e R. Carl Hoseney (Eds), AACC, St Paul, MN, USA

- Eliasson, A.-C., Bohlin, L., 1982. Rheological properties of concentrated wheat starch gels. *Starch/Stärke*, 34 (8): 267-271
- Eliasson, A.-C., Carlson, T.L.-G., Mieziš, Y., 1981. Some effects of starch lipids on the thermal and rheological properties of wheat starch. *Starch/Stärke*, 33(4):130-134
- Eliasson, A.-C., Gudmundsson, M., 1996. Starch: physicochemical and functional aspects. in *"Carbohydrates in Food"* Ann-Charlotte Eliasson (Ed.), Marcel Dekker, Inc. NY, pp.431-503
- Eliasson, A.-C., Karlsson, R., 1983. Gelatinization properties of different size classes of wheat starch granules measured with differential scanning calorimetry. *Starch/Stärke*, 35 (4): 130-133
- Eliasson, A.-C., Krog, N., 1985. Physical properties of amylose-monoglyceride complexes. *J. Cereal Sci.* 3:239-249
- Eliasson, A.-C., Larsson, K., 1993. in *"Cereals in Breadmaking. A Molecular Colloidal Approach"* A.-C Eliasson, K. Larsson (Eds), Marcel Dekker Inc., NY
- Eliasson, A.-C., Lundh, G., 1989. Rheological and interfacial behaviour of some wheat protein fractions. *J. Texture Stud.*, 20: 431-441
- Ellis, H.S., Ring, S.G., 1985. A study of some factors influencing amylose gelation. *Carbohydr. Polym.*, 5:201
- Evans, I. D., 1986. An investigation of starch/surfactant interactions using viscometry and differential scanning calorimetry. *Starch/Stärke*, 38:227-235
- Evans, I. D., Haisman, D.R., 1979. Rheology of gelatinised starch suspensions. *J. Texture Stud.*, 10:347-370.
- Evers, A.D., Blakeney, A.B., O'Brien, L., 1999. Cereal structure and composition. *Austr. J. Agric. Res.*, 50(5): 629-650
- Ewald, C.M., Perlin, A.S., 1959. The arrangement of branching in an arabinoxylan from wheat flour. *Can. J. Chem.*, 37:1254
- Ewart, J. A. P., 1968. A hypothesis for the structure and rheology of glutenin. *J. Sci. Food Agric.*, 19:617

- Farrand, E.A., 1964. Flour properties in relation to the modern bread processes in the United Kingdom, with special reference to α -amylase and starch damage. *Cereal Chem.*, 41: 98-111
- Faurot, A-L., Saulnier, L., Bérot, S., Popineau, Y., Petit, M-D., Rouau, X., Thibault, J-F., 1996. Large scale isolation of water-soluble and water-insoluble pentosans from wheat flour. *Lebensm. Wissen. Technol.*, 28: 436-441
- Fennema, O.R., 1996, "*Food Chemistry*" – 3rd ed., O.R: Fennema (Ed), Marcell Dekker, NY
- Ferry, J.D., 1980. *Viscoelastic Properties of Polymers*. 3rd ed., John Wiley & Sons, New York, pp. 33-55
- Field, J.M., Shewry, P.R., Mifflin, B.J., 1983. Aggregation states of alcohol-soluble storage proteins of barley, rye, wheat and maize. *J. Sci. Food Agric.*, 4: 362-369
- Field, J.M., Tatham, A.S., Baker, A., Shewry, P.R., 1986. The structure of C hordein. *FEBS Lett.*, 200:76-80
- Field, J.M., Tatham, A.S., Shewry, P.R., 1987. The structure of a high-Mr subunit of durum-wheat (*Triticum durum*) gluten. *Biochemistry Journal*, 247:215-221
- Figueroa-Espinoza, M.C., Morel, M. -H., Surget, A., Asther, M., Moukha, S., Sigoillot, J., -C., Rouau, X., 1999. Attempt to cross-link feruloylated arabinoxylans and proteins with a fungal laccase. *Food Hydrocolloids*, 13:65-71
- Fincher, G.B., Stone, B.A., 1974. A water-soluble arabinogalactan-peptide from wheat endosperm. *Austr. J. Biol. Sci.*, 27:117-132
- Finney, K.F., 1943. Fractionating and reconstitution techniques as tools in wheat flour research. *Cereal Chem.*, 20:381-396
- Finney, K.F., Barmore, M.A., 1948. Loaf volume and protein content of hard winter and spring wheats. *Cereal Chem.*, 25:291-312
- Finney, K.F., Shogren, M.D., 1972. A 10-gram mixograph for determining and predicting functional properties of wheat flours. *Baker's Dig.*, 46(2):32
- Fitzgerald, J.V., Matusik, F.J., Walsh, T.M., 1988. New method and instrument for rheology of dough. *Cereal Food World*, 33 (11): 908-912

- Flint, O., 1994. Food starches. in "*Food Microscopy*", O. Flint (Ed.), Bios Scientific Publishers, UK
- Flory, P.J., 1953. "*Principles of Polymer Chemistry*", Cornell University Press, Ithaca, N.Y.
- Forcinti, R. e LeGrys, G.A., 1989. The effect of glúten content on the staling of wheat starch. in "*Trends in food science*", A.H. Gee, L.W.Sze e F.C. Woo (Eds.), Proceedings of the 7th World Congress of Food Science and Technology, Singapore, pp.179-181
- Frazier, P.J., Shearing, K.M., Daniels, N.W.R., Eggit, P.W.R., 1985. The ligolin-lipid complex in gluten. in "*Gluten complex*", A. Graveland and J.H.E. Moonen (Eds), TNO, Wageningen, NL, pp. 91
- Frith, W.J., Lips, A., 1995. The rheology of concentrated suspensions of deformable particles. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 61: 161-189
- Fu, J., Mulvaney, S.J., Cohen, C., 1997. Effect of added fat on the rheological properties of wheat flour dough, *Cereal Chem.*, 74(3):304-311
- Fyfe, C.A., 1983. "*Solid state NMR for chemists*", C.A. Fyfe (Ed), CFC Press, Ontario, Canada
- Fyfe, C.A., Stephenson, P.J., Taylor, M.G., Bluhm, T.L., Deslnades, Y., Marchessault, R.H., 1984. *Macromolecules*, 17:50
- Gallant, D.J., Bouchet, B., Baldwin, P.M., 1997. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydr. Polym.*, 32:177-191
- Galliard, T., Bowler, P., 1986. Starch – composition, fine structure and architecture, *J. Food Microstruct.*, 177-191
- Gama, A.C., Santos, D.M.J., Lopes da Silva, J.A, 2000. Influence of wheat polyssacharides on the rheological properties of gluten and doughs. in "*Wheat Gluten*" - P.R. Shewry and A.S. Tatham (Eds), Royal Society of Chemistry, Cambridge UK, pp. 503-506
- Geissman, T., Neukom, H., 1973. On the composition of the water soluble wheat flour pentosans and their oxidative gelation. *Lebensm. Wissen. Technol.*, 6:59-62

- Ghiasi, K., Varriano-Marston, E., Hosney, R.C., 1980. Gelatinization of wheat starch. II. Starch-surfactant interaction. *Cereal Chem.*, 59(2) : 86-88
- Gianibelli, M.C., Larroque, O.R., MacRitchie, F., Wrigley, C.W., 2001. Biochemical, genetic and molecular characterization of wheat endosperm. www.scisoc.org/aacc/lectures&features/gianibelli.pdf
- Gibson, T.S., Al Qalla, H., McCleary, B.V., 1991. An improved enzymatic method for the measurement of starch damage in wheat flour. *J. Cereal Sci.*, 15: 15-27.
- Gibson, T.S., Solah, V.A., McCleary, B.V., 1997. A procedure to measure amylose in cereal starches and flours with concanavalin A. *J. Cereal Sci.*, 25:11-119
- Gidley, M.J., Bociek, S.M., 1985. Molecular organization in starches. A ^{13}C -CP/MAS NMR study. *J. Am. Chem. Soc.*, 107:7040
- Gidley, M.J., Bociek, S.M., 1988. ^{13}C CP/MAS NMR studies of amylose inclusion complexes, cyclodextrins, and the amorphous phase of starch granules: relationships between glycosidic linkage conformation and solid-state ^{13}C chemical shifts. *J. Am. Chem. Soc.*, 107:7040
- Gil, A.M., Alberti, E., Santos, D., 2001. An insight in the structure of foods using ^{13}C and ^1H magic angle spinning (MAS), in *NMR: application to wheat flour dough "Magnetic Resonance in Food Science - A view to the future"* - G.A. Webb, P.S. Belton, A.M. Gil, I. Delgadillo (Eds), Royal S.Ch., Cambridge UK
- Gil, A.M., Alberti, E., Tatham, A.S., Belton, P.S., Humpfer, E., Spraul, M., 1997a. Magic angle spinning NMR study of the hydration of the wheat seed storage protein omega-gliadins. *Magn. Res. Chem.*, 110: 3820-3829
- Gil, A.M., Masui, K., Naitô, A., Tatham, A.S., Belton, P.S., Saitô, H., 1997b. A ^{13}C -NMR study on the conformational and dynamic properties of a cereal seed storage protein, C-hordein, and its model peptides. *Biopolymers*, 41:289-300
- Gil, V.M.S., Geraldes, C.F.G.C., 1987. "*Ressonância Magnética Nuclear*", Fundação Calouste Gulbenkian, Coimbra, Portugal
- Girhamar, U., Nair, B.M., 1995. *Food Hydrocolloids*, 9(2):133-140

- Giroux, M.J. & Morris, C.F., 1998. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroinduline a and b. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:6262-6266
- Glenn, G.M., Jonhston, R.K., 1992. Mechanical properties of starch, protein and endosperm and their relationship to hardness in wheat. *Food Structure*, 11:187-199
- Glenn, G.M., Saunders, R.M., 1990. Physical and structural properties of wheat endosperm associated with grain texture. *Cereal Chem.*, 67:176-182
- Gontard, N., Ring, S., 1996. Edible wheat gluten film: influence of water content on glass transition temperature. *J. Agric. Food Chem.*, 44:3474-3478
- Grant, A., Belton, P.S., Cloquhoun, I.J., Parker, M.L., Plijter, J.J., Shewry, P.R., Tatham, A.S., Wellner, N., 1999. Effects of temperature on sorption of water by wheat gluten determined using deuterium nuclear magnetic ressonance. *Cereal Chem.*, 76(2): 219-226
- Graveland, A., Bosveld, P., Lichtendonk, W.J., Moonen, H.H.E., Scheepstra, A, 1982. Extraction and fractionation of wheat flour proteins. *J. Sci. Food Agric.*, 33:117-1128
- Greenwell, P., Schofield, J.D., 1986. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. *Cereal Chem.*, 63:179
- Gudmundsson, M., Eliasson, A.-C., Bengtsson, S., Åman, P., 1991. The effects of water soluble arabinoxylan on gelatinisation and retrogradation of starch. *Starch/Stärke*, 43: 5-10.
- Gueissman, T., Neukom, H., 1973. A note on ferulic acid as a constituent of water-insoluble pentosans of wheat dlour. *Cereal Chem.*, 50:414-416
- Guerrieri, N., Eynard, L., Lavelli, V., Cerleti, P., 1997. Interactions of protein and starch studied through amylo-glucosidase action. *Cereal Chem.*, 74(6): 846-850
- Gupta, R.B., MacRitchie, F., 1991. A rapid one-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of subunit composition of glutenin in wheat. *J. Cereal Sci.*, 14:105-109
- Hahn, D.E., Hood, L.F., 1987. Factors influencing corn starch-lipid complexing. *Cereal Chem.*, 64:81-85

- Hansen, L M., Hoseney, R.C., Faubion, J.M., 1991. Oscillatory rheometry of starch-water systems: effect of starch concentration and temperature. *Cereal Chem.*, 68: 347-351.
- Hargreaves, J., Le Meste, M., J., Popineau, Y., 1994. ESR studies of gluten-lipid systems. *J. Cereal Sci.*, 19 :107
- Hargreaves, J., Popineau, Y., Le Meste, M., Hemminga, M., 1995b. Molecular flexibility in wheat gluten proteins submitted to heating. *FEBS Lett.*, 372: 103-107
- Hargreaves, J., Popineau, Y., Marion, D., Lefebvre, J., Le Meste, M., 1995. Gluten viscoelasticity is not lipid-mediated. A rheological and molecular flexibility study on lipid and non-prolamin protein depleted gluteins. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 1170-1176
- Harris, R.H., 1942. The baking qualities of gluten and starch prepared from different qualities of starches prepared from different wheat varieties. *Baker's Dig.*, 16(4):217
- Harris, R.K., 1986. "*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*", Longman Group UK, England
- Hashimoto, S., Shrogen, M.D., Pomeranz, Y., 1987. Cereal Pentosans: their estimation and significance. I. Pentosans in wheat and milled wheat products. *Cereal Chem.*, 64 (1) : 30-34
- Hawthorn, J., 1981, "*Foundations of Food Science*", W.H. Freeman (ed.), Oxford, San Francisco
- Hayakawa, K., Tanaka, K., Nakamura, T., Endo, S., Hoshino, T., 1997. Quality characteristics of waxy hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.): Properties of starch gelatinization and retrogradation. *Cereal Chem.*, 74(5): 576-580
- He, H., Hoseney, R.C., 1991. Differences in gas retention and, protein solubility and rheological properties between flours of different baking quality. *Cereal Chem.*, 68:526-530
- Hibberd, G.E., 1970. Dynamic viscoelastic behaviour of wheat flour doughs. Part III: The influence of the starch granules. *Rheol. Acta*, 9: 501-505
- Hibberd, G.E., Parker, N.S., 1970. Dynamic viscoelastic behavior of wheat flour doughs. III Influence of starch granules. *Rheol. Acta*, 9:501

- Hibberd, G.E., Parker, N.S., 1975. Dynamic Viscoelastic behavior of wheat flour doughs
Part IV: Non-linear behaviour. *Rheol. Acta*, 14: 151-157
- Hibberd, G.E., Parker, N.S., 1979. Non-linear creep and creep recovery of wheat flour
doughs. *Cereal Chem.*, 56:232-235
- Hibberd, G.E., Wallace, W.J., 1966. Dynamic viscoelastic behaviour of wheat flour
doughs. Part I. Linear aspects. *Rheol. Acta*, 5(3): 193-198
- Hizukuri, S., 1985. Relationship between the distribution of the chain-length of amylopectin
and the crystalline structure of starch granules. *Carbohydr. Res.*, 141:295-306
- Hoffman, R.A., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., 1992. Structural features of a water-
soluble arabinoxylan from the endosperm of wheat. *Carbohydr. Res.*, 226:303
- Holm, J., Björck, I., Asp, N.G., Sjöberg, L.B., 1985. Starch availability in vitro and in vivo
after flaking, steam-cooling and popping of wheat. *J. Cereal Sci.*, 3:193-206
- Horii, F., Yamamoto, H., Hirai, A., Kitamaru, R., 1987. Structural study of amylose
polymorphs by cross-polarization-magic angle spinning ^{13}C -NMR spectroscopy.
Carbohydr. Res., 160:29
- Hoseney, R.C., 1984. Functional properties of pentosans in baked foods. *Food Technology*,
Jan:114-117
- Hoseney, R.C., 1994. *“Principles of Cereal Science and Technology”* 2nd ed., AACC, St.
Paul, MN.
- Hoseney, R.C., 1998. *Principles of Cereal Science and Technology*, 2nd ed. R.C. Hoseney
(Ed.), American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN
- Hoseney, R.C., Faubion, J.M., 1981. A mechanism for the oxidative gelation of wheat
flour pentosans of wheat flour. *Cereal Chem.*, 56:58:421
- Hoseney, R.C., Finney, K.F., Pomeranz, Y., Shogren, M.D., 1971. Functional
(breadmaking) and biochemical properties of wheat flour components. VIII. Starch.
Cereal Chem., 48: 191-201

- Hoseney, R.C., Finney, K.F., Shogren, M.D., Pomeranz, Y., 1969, Functional (breadmaking) and biochemical properties of wheat flour components. II. Role on water solubles. *Cereal Chem.*, 46:117-125
- Hoseney, R.C., Rogers, D.E., 1990. The formation and properties of wheat flour doughs. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 20 (2): 73-93
- Hoseney, R.C., Zeleznak, K.J., Lai, C.S., 1986. Wheat gluten: a glassy polymer. *Cereal Chem.*, 63:285-286
- Huang, S., Moss, R., 1991. Light microscopy observations on the mechanism of dough development in Chinese steamed bread production. *Food Microstruct.*, 10:289-293
- Huebner, F.R., Bietz, J.A., 1985. Detection of quality differences among wheats by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 327:333-342
- Huebner, F.R., Bietz, J.A., 1986. Assessment of the potential breadmaking quality of hard red spring wheats by reversed-phase high-performance liquid chromatography of gliadins. *J. Cereal Sci.*, 4:379-388
- Huebner, F.R., Wall, J.S., 1976. Fractionation and quantitative differences of glutenin from wheat varieties varying in baking quality. *Cereal Chem.*, 53:258
- Huggins, M.L., 1942. The viscosity of dilute solutions of linear-chain molecules. IV. Dependence on concentration. *J. Am. Chem. Soc.* 64:2716
- Inda, A., Rha, C., 1991. Dynamic viscoelastic properties of wheat gluten: the effects of hydrogen bonding modified by urea and deuterium oxide. *J. Texture Stud.*, 22:393-411
- Irvine, G.N., Bradley, J.W., Martin, G.C., 1961. A farinograph procedure for macaroni dough. *Cereal Chem.*, 38: 153-164
- Izydorczik, M.S., Biliaderis, C.G., 1995. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.*, 28: 33-48
- Izydorczyk, M., Biliaderis, C.G., Bushuk, W., 1991. Physical properties of water-soluble pentosans from different wheat varieties. *Cereal Chem.*, 68 (2): 145-150
- Izydorczyk, M.S., Biliaderis, C.G., 1992. Influence of structure on the physicochemical properties of wheat arabinoxylan. *Carbohydr. Polym.*, 17: 237-247

- Izydorczyk, M.S., Biliaderis, C.G., Bushuk, W., 1990. Oxidative gelation studies of water-soluble pentosans from wheat. *J. Cereal Sci.*, 11:153-169
- Jackson, E.A., Holt, L.M., Payne, P.I., 1983. Characterization of high molecular weight glutenin subunits of wheat endosperm by two dimensional electrophoresis and chromosomal localization of their controlling genes. *Theor. Appl. Genet.*, 66:29-37
- Jacobson, M.R., Obanni, M., Bemiller, J.N., 1997. Retrogradation of starches from different botanical sources. *Cereal Chem.*, 74 (5): 511-518
- Jane, J., Chen, Y.Y., Lee, L.F., McPherson, A.E., Wong, K.S., Radosavljevic, M., Kasemsuwan, T., 1999. Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal Chem.*, 76 (5): 629-637
- Jane, J., Kasemsuwan, T., Leas, S., IA, A., Zobel, H., IL, D., Robyt, J.F., 1994. Anthology of starch granule morphology by scanning electron microscopy. *Starch/Stärke*, 46(4): 121-129
- Jane, J.-L., Robyt, J.F., 1985. ^{13}C -NMR study of the conformation of helical complexes of amylopectin and amylose in solution. *Carbohydr. Res.*, 140:21
- Janckiewicz, M., Michniewicz, J., 1987. The effect of soluble pentosans isolated from rye grain on staling of bread. *Food Chem.*, 25:241
- Janssen, A.M., van Vliet, T., Vereijken, J.M., 1996a. Rheological behaviour of wheat glutens at small and large deformations. Effect of gluten composition. *J. Cereal Sci.* 23: 33-42
- Janssen, A.M., van Vliet, T., Vereijken, J.M., 1996b. Rheological behaviour of wheat glutens at small and large deformations. Comparison of two gluten differing in bread making potential. *J. Cereal Sci.*, 23:19-31
- Jaska, E., 1971. Starch gelatinization as detected by proton magnetic resonance. *Cereal Chem.*, 48:437
- Jelaca, S.L., Hlynka, I., 1971. Water-binding capacity of wheat flour crude pentosans and their relation to mixing characteristics of doughs. *Cereal Chem.*, 48:211-222

- Jelaca, S.L., Hlynka, I., 1972. Effect of wheat flour pentosans in dough, gluten and bread. *Cereal Chem.*, 49:489
- Jones, I.K., Carnegie, P.R., 1971. Binding of oxidised glutathione to dough properties and a new explanation, involving thiol-disulphide exchange, of the physical properties of dough. *J. Sci. Food Agric.*, 22:358-364
- Jovanovich, G., Zamponi, R.A., Lupano, C.E., Anon, M.C, 1992. Effect of water content on the formation and dissociation of the amylose-lipid complex in wheat-flour. *J. Agric. Food Chem.*, 40:1789-1793
- Kalichevsky, M.T., Orford, P.D., Ring, S.G., 1986. The incompatibility of concentrated aqueous solutions of dextran and amylose and its effect on amylose gelation. *Carbohydr Polym.*, 6: 145-154
- Kasarda, D.D., Bernardin, J.E., Nimmo, C.C., 1976. Wheat Proteins, in “*Advances in Cereal Science and Technology*” Vol.1, Y. Pomeranz, Ed., American Association of Cereal Chemists, ST. Paul, MN
- Khatkar, B.S., Bell, A.C., Schofield, J.D., 1995. The dynamic rheological properties of gluteins and gluten subfractions from wheats of good and poor bread making quality. *J. Cereal Sci.*, 22:29-44
- Kim, S.K., D'Appolonia, B.L., 1977a. Effect of pentosans on the retrogradation of wheat starch gels. *Cereal Chem.*, 54:150-160
- Kim, S.K., D'Appolonia, B.L., 1977b. Bread Staling studies. III. Effect of pentosans on dough, bread, and bread staling rate. *Cereal Chem.*, 54:225-229
- Kim, Y., Wang, S.S., 1999., Starch cooking with limited water as affected by zein and guar gum. *J. Food Sci.*, 64(1): 133-135.
- Koh, B.K., Karwe, M.V., Schaich, K.M., 1996. Effects of cysteine on free radical production and protein modification in extruded wheat flour. *Cereal Chem.*, 73(1): 115-122
- Kokini, J.L., 1994. Rheological properties of foods. *Handbook of Food Engineering*, D.R. Heldman and D.B. Lund, eds, Marcel Dekker, NY, pp 1-144

- Kokini, J.L., Cocero, A., Madeca, H., De Graaf, E., 1994. The development of state diagrams for cereal proteins. *Trends Food Sci. Technol.*, 5: 281-288
- Kokini, J.L., Lai, L.-S., Chedid, L.L., 1992. Effect of starch structure on starch rheological properties. *Food Technology*, 46 (6):142-145
- Kovac, P., Hirsch, J., Shashkov, A.S., Usov, A.I., Yarotsky, S.V., 1980. ¹³C-NMR spectra of xulo-oligosaccharides and their application to the elucidation of xylan structures. *Carbohydr. Res.*, 85:117
- Kovacs, M.I.P., Dahlke, G., Noll, J.S., 1994. Gluten viscoelasticity: its usefulness in the canadian durum wheat breeding program. *J. Cereal Sci.* 19:251-257
- Kowblansky, M., 1985. Calorimetric investigation of inclusion complexes of amylose with long-chain aliphatic compounds containing different functional groups, *Macromolecules*, 18:1776-1779
- Kraemer, E.O., 1938. Molecular weights of cellulose and cellulose derivatives. *Ind. Eng. Chem.*, 30:1200-103
- Krishnarau, L., Hoseney, R.C., 1994. Enzymes increase loaf volume of bread supplemented with starch tailings and insoluble pentosans. *J. Food Sci.*, 59(6): 1251-1254
- Kugimiya, M., Donovan, J. W., 1981. Calorimetric determination of the amylose content of starches based on formation and melting of the amylose-lysolecithin complex. *J. Food Sci.*, 46:765-770.
- Kulp, K., 1968. Pentosans of wheat endosperm, *Cereal Sci. Today*, 13:339-350
- Kulp, K., Lorenz, K., 1981. *Baker's Dig.*, 55(5):24
- Kulp, K., Lorenz, K., Stone, M., 1991. Functionality of carbohydrate ingredients in bakery products. *Food Technology*, 45(3):136,138-140, 142
- Labat, E., Rouau, X., Morel, M-H., 2002. Effect of flour water-extractable pentosans on molecular associations in gluten during mixing. *Lebensmit.Wissen.und Technol.*, 35(2):185-189

- Lafiandra, D., Masci, S., D'Ovidio, R., Margiotta, B., 2000. The genetics of wheat gluten proteins: an overview. in "*Wheat Gluten*" - P.R. Shewry and A.S. Tatham (Eds), Royal Society of Chemistry, Cambridge UK, pp. 3-10
- Lagarrigue, S., Alvarez, G., 2001. The rheology of starch dispersions at high temperatures and high shear rates: a review. *J. Food Eng.*, 50: 189-202
- Larsson, H., Eliasson, A.-C., Johansson, E., Svensson, G., 2000. Influence of added starch on mixing of dough made with three wheat flours differing in high molecular weight subunit composition: rheological behaviour. *Cereal Chem.*, 77(5):633-639
- Larsson, K., 1988. Functionality of wheat lipids in relation to gluten gel formation, in "*Chemistry and physics of baking – materials, processes and products*". J. M. V. Blanshard, P. J. Frazier and T. Galliard (Eds), Royal Society of Chemistry, London, UK, pp. 63-74
- Larsson, P.T., Wickholm, K., Iversen, T., 1997. A CP/MAS ^{13}C NMR investigation of molecular ordering in celluloses. *Carbohydr. Res.*, 302: 19-25
- Lásztity, R., 1972. Recent results in cereal protein research. *Period. Polytech. (Techn. Univ. Budapest)*, 16:331
- Lásztity, R., 1996. "*The Chemistry of Cereal Proteins*" - 2nd ed, R. Lasztity (Ed.), CRC Press, Boca Raton, USA
- Lásztity, R., S. Tomoskozi, S., Haraszi, R., Révay, T., Kárpáti, M., 2000. Is the role of high molecular weight glutenin sub-units (HMW-GS) decisive in determination of baking quality of wheat?. in "*Wheat Gluten*" P.R. Shewry e A.S. Tatham (Eds), Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 38-42
- Launay, B., 1996, Rheological techniques. in "*Analytical Techniques for Foods and Agricultural Products*", G. Linden (ed.), VCH Publishers Inc. USA
- Launay, B., Buré, J., 1977. Use of the Chopin Alveographe as a rheological tool. II. Dough properties in biaxial extension. *Cereal Chem.* 54:1152
- Launay, B., Buré, J., 1974. Stress relaxation in wheat flour doughs following a finite period of shearing. I. Quantitative study. *Cereal Chem.*, 51 :151-162

- Lazaridou, A., Biliaderis, C.G., Izydorczyk, M.S., 2003. Molecular size effects on rheological properties of oat β -glucans in solutions and gels. *Food Hydrocolloids*, 17(5):693-712
- Le Meste, M., Davidou, S., 1995. Lipi-protein interactions in foods. in *“Ingredient Interactions: Effects in Food Quality”*, Anilkumar G. Gaonkar (Ed.), Marcel Dekker, NY, USA, pp. 235-268
- Le Meste, M., Simatos, D., Gervais, P., 1995. Interactions of water with food components. in *“Ingredient Interactions: Effects in Food Quality”*, Anilkumar G. Gaonkar (Ed.), Marcel Dekker, NY, USA, pp. 85-130
- Lechert, H., Scoggins, W.C., Basier, W.D., Shwier, I., 1988. Neuere Erkenntnisse zur struktur das wasser in der starke. *Starch/Stärke*, 40(7):245-250
- Lee, C.C., 1962. Electron paramagnetic resonance and baking studies on gamma irradiated flour. *Cereal Chem.*, 39:147-154
- Lee, L., Ng, P.K.W., Whallon, J.H., Steffe, J.F., 2001. Relationship between rheological properties and microstructural characteristics of non-developed, partially developed and developed doughs. *Cereal Chem.*, 78 (4):447-452
- Lefebvre, J., Popineau, Y., Cornec, M., 1994. Viscoelastic properties of gluten proteins: influence of prolamin composition and of temperature. *Assoc.Cereal Res.*, 180-189
- Leonard, A-L., Cisneros, F., Kokini, J.L., 1999. Use of the rubber elasticity theory to characterize the viscoelastic properties of wheat flour doughs. *Cereal Chem.*, 76(2):243-248
- Leung, H.K., Magnuson, J.A., Bruinsma, B.L., 1979. Pulsed nuclear magnetic resonance study of water mobility in flour doughs. *J. Food Sci.*, 44:1408-1411
- Leung, H.K., Magnuson, J.A., Bruinsma, B.L., 1983. Water binding of wheat flour doughs and breads as studied by deutron relaxation. *J. Food Sci.*, 48:95-99
- Levine, H., Slade, L., 1988. Water as a plasticizer: physicochemical aspects of low moisture polymeric systems. *Water Sci. Rev.*, 3:79-185
- Levine, H., Slade, L., 1990. Influence of the glassy and rubbery states on the thermal, mechanical, and structural properties of doughs and baked products. in *“Dough*

- Rheology and Baked Product texture: Theory and Practice*", H. Faridi e J. M. Faubion (Eds.), Van Nostrand Reinhold/AVI: New York
- Lichtendonk, W.J., Kelfkens, M., Orsel, R., Bekkers, A.C.A.P.A., Plijter, J., 2000. The impact of water soluble pentosans on dough properties. in "*Wheat Gluten*" - P.R. Shewry and A.S. Tatham (Eds), Royal Society of Chemistry, Cambridge UK, pp. 512-518
- Lii, C.-Y, Shao, Y.-Y., Tseng, K.-H, 1995. Gelation mechanism and rheological properties of rice starch, *Cereal Chem.*, 72(4): 393-400
- Lindhal, L., Eliasson, A.-C., 1986. Effects of wheat proteins on the viscoelastic properties of starch gels. *J. Sci. Food Agric.*, 37: 1125-1132
- Lindsay, M., Skerritt, J.H., 1999. The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure-function perspectives. *Trends Food Sci. Technol.*, 10: 247-253
- Lineack, D.R., 1986. Current concepts of starch structure and its impact on properties. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 33(1): 80-88
- Lineback, D.R., Kakuda, N., Tsen, C.C., 1977. Carbohydrate composition of water soluble pentosans from different types of wheat flours. *J. Food Sci.*, 42: 461-467
- Lipatov, Y., 1977. *Adv. Polym. Sci.*, 22:1
- Liu, H., Lelièvre, J., 1993. A model of starch gelatinization linking differential scanning calorimetry and birefringence measurements. *Carbohydr. Polym.*, 20:1-5
- Longton, J., LeGrys, G.A., 1981. Differential scanning calorimetry studies on the crystallization of ageing starch gels. *Starch/Stärke* 33: 410-414.
- Loosveld, A.M.A., Grobet, P.J., Delcour, J.A., 1997. Contents and structural features of water-extractable arabinogalactan in wheat flour fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 45(6): 1998-2002.
- Lopes da Silva, J.A., Gonçalves, M.P., Rao, M.A., 1992. Rheological properties of high-methoxyl pectin and locust bean gum solutions in steady shear. *J. Food Sci.*, 57(2): 443-448.
- Lopes da Silva, J.A., Rao, M.A., Fu, J.-T., 1998. Rheology and structure development and loss during gelation and melting. in "*Phase/State Transitions in Foods - Chemical,*

- Structural and Rheological Changes*” M.A. Rao e R.W. Hartel (Eds), Marcel Dekker, Inc, 111-157
- Lopes da Silva, M.F.A.P., Beirão da Costa, M.L.D.M, 1997. Características calorimétricas de amidos de castanha obtidos por diferentes métodos de isolamento., Actas do 3º Encontro de Química dos Alimentos, Faro 1997, 86-88
- Lowry , O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Lukaschek, M.K.G., Schmidt, C.G.A.E., Polimeno, A., 2002. Evaluation of the viscoelastic properties of a nematic dimer by cone-and-plate rheo-nuclear magnetic resonance spectroscopy and comparison with Leslie-Ericksen theory. J. Chem. Phys., 117(9): 4550 - 4556
- Lund, D., 1988. Influence of time, temperature, moisture, ingredients, and processing conditions on starch gelatinization. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 20 (4) 249-272
- MacRitchie, F., 1979. A relation between gluten amide content and baking performance of wheat flours. J. Food Technol., 14:595-601
- MacRitchie, F., 1980. Studies of gluten protein from wheat flours. Cereal Food World, 25(7):382-385
- MacRitchie, F., 1984. Baking quality of wheat flours. Adv. Food Res., 29:201-277
- MacRitchie, F., 1985. Studies of the methodology for fractionation and reconstitution of wheat flours. J. Cereal Sci., 30: 221-230
- MacRitchie, F., 1987. Evaluation of contributions from wheat protein fractions to dough mixing and breadmaking. J. Cereal Sci. 6:259-268
- MacRitchie, F., Kasarda, D.D., Kuzmicky, D.D., 1991. Characterization of wheat protein fractions differing in contributions to breadmaking quality. Cereal Chem., 68 (2):122-130
- Malouf, R.B., Lin, W.D.A., Hoseney, R.C., 1992. Wheat hardness. II. Effect of starch granule protein on endosperm tensile strength. Cereal Chem., 69:169-173
- Marchant, J.L., Blanshard, J.M.V., 1978. Studies of the dynamics of the gelatinization of starch granules employing a small angle light scattering system. Starch/Stärke, 30:257

- Marion, D., Dubreil, L., Wilde, P., Clark, D.C., 1998. Lipid, lipid-protein interactions and the quality of baked cereal products. in *"Interactions: The Keys to Cereal Quality"*, Rob J. Hamer e R. Carl Hoseney (Eds.), American Association of Cereal Chemists Inc., St Paul, MN, USA, pp-131-167
- Martin, M.L., Hoseney, R.C., 1991. A mechanism of bread firming. II. Role of starch hydrolysing enzymes. *Cereal Chem.*, 68:503-507
- Martinant, J.P., Billot, A., Bouguennec, A., Charmot, G., Saulnier, L., Blanlard, G., 1999. Genetic and environmental variations in water-extractable arabinoxylans content and flour extract viscosity. *J. Cereal Sci.*, 30(1): 45-48
- Martinant, J.P., Nicolas, Y., Bouguennec, A., Popineau, Y., Saulnier, L., Branlard, G., 1998. Relationships between mixograph parameters and indices of wheat grain quality. *J. Cereal Sci.*, 14: 203-208
- Marwalker, H.U. and Neukom, H., 1976. Diferulic acid as a possible cross-link in hemicelluloses from wheat endosperm. *Phytochemistry*, 15: 836
- Masci, S. Porceddu, E. and Lafiandra, D., 1991a. Two-dimensional electrophoresis of 1D-encoded B and D glutenin subunits in common wheats with similar omega gliadins. *Biochem. Genet.*, 29:403-413
- Masci, S. Porceddu, E., Colaprico, G and Lafiandra, D., 1991b. Comparison of the B and D subunits of the glutenin subunits encoded at the *Glu-D3* locus in two biotypes of the common wheat cultivar Newton with different technological characteristics. *J. Cereal Sci.* 14:35-46
- Masci, S., Lafiandra, D., Porceddu, E., Lew, E. J. –L. Tao, H.P., Kasarda, D.D., 1993. D-glutenin subunits: N-terminal sequences and evidence for the presence of cysteine. *Cereal Chem.*, 70:100-104
- McCleary, B.V., Solah, V., Gibson, T.S., 1994. Quantitative determination of total starch in cereal flours and products. *J. Cereal Sci.*, 20:51-58
- McCormick, K.M., Panozzo, J.F., Eagles, H.A., 1995. Starch pasting properties and the genetic relationships of wheat cultivars important to Victorian Wheat Breeding. *Austr. J. Agric. Sci.*, 46: 861-871

- McIntyre, D.D., Ho, C., Vogel, H.J., 1990. One dimension nuclear magnetic resonance studies of starch and starch products. *Starch/Stärke*, 42:260-267
- Meiboom, S., Gill, D., 1958. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Rev. Sci. Instrum.*, 29:688
- Meredith, P., 1981. Large and small starch granules in wheat - Are they really different?, *Starch/Stärke*, 33(2): 40-44
- Meredith, P., Dengate, H.N., Morrison, W.R., 1978. The lipids of various sizes of wheat starch granules. *Starch/Stärke*, 30(4): 119-125
- Mestres, C., Colonna, P., Buleon, A., 1988. Gelation and crystallization of maize starch after pasting, drum-drying or extrusion cooking. *J. Cereal Sci.*, 7:123-134
- Meuser, F., Suckow, P., 1988. Non-starch polysaccharides. in *"Chemistry and physics of baking – materials, processes and products"*. J. M. V. Blanshard, P. J. Frazier e T. Galliard (Eds), Royal Society of Chemistry, London, UK, pp. 42-61
- Michniewicz, J., Biliaderis, C.G., Bushuk, W., 1991. Effect of added pentosans on some physical and technological characteristics of dough and gluten. *Cereal Chem.*, 68 (3): 252-258
- Mikhaylenko, G.G., Czuchajowska, Z., Baik, B.-K., Kidwell, K.K., 2000. Environmental Influences on flour composition, dough rheology and baking quality of spring wheat. *Cereal Chem.*, 77 (4):507-511
- Miles, M.J., Carr, H.J., MacMaster, T.C., I'Anson, K.J., Belton, P.S., Morris, V.J., Field, J.M., Shwery, P.R., Tatham, A.S., 1991. Scanning tunneling microscopy of a wheat seed storage protein reveals details of an unusual supersecondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:68-71
- Miles, M.J., Morris, V.J., Orford, P.D., Ring, S.G., 1985. The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydr. Res.*, 135: 271-281.
- Miller, B.S., Derby, R.I., Trimbo, H.B., 1973. A pictorial explanation for the increase in viscosity of a heated wheat starch-water suspension. *J. Series No.565, Generall Mills Inc.*, 271-281

- Miller, K.A., Hoseney, R.C., 1999. Dynamic rheological properties of wheat starch-gluten doughs. *Cereal Chem.*, 76:1, 105-109
- Moore, A.M., Muñoz, I.M., Hoseney, R.C., 1990. Factors affecting the oxidative gelation of wheat water-solubles. *Cereal Chem.*, 67 (1): 81-84
- Morgan, K., Furneaux, R.H., Larsen, N.G., 1995. Solid-state NMR studies on the structure of starch granules. *Carbohydr. Res.*, 276:387-399
- Morris, E.R., 1990. Mixed polymer gels. in *"Food Gels"*, Applied Food Science Series, P. Harris (Ed), Elsevier, Amsterdam, pp. 291-360
- Morris, E.R., Rees, D.A., Robinson, G., Young, G.A., 1980. *J. Mol. Biol.*, 138:363
- Morrison, W.R., 1994. Wheat Lipids: Structure and Functionality. in *"Wheat: production, properties and quality"*, W. Bushuk and V.F. Rasper, eds, Blackie Academic and Professional, Glasgow
- Morrison, W.R., Greenwell, P., Law, C.N., Sulaiman, B.D., 1992. Occurrence of fiabrilin, a low molecular weight protein associated with grain softness, on starch granules isolated from some wheat and related species. *J. Cereal Sci.* 15:143-149
- Morrison, W.R., Law, R.V., Snape, C.E., 1993c. Evidence of inclusion complexes of lipids with V-amilose in maize, rice and oat starches. *J. Cereal Sci.*, 18:107
- Morrison, W.R., Scott, D.C., 1986. Measurement of the dimension of wheat starch granule populations using a coulter counter with 100-channel analyzer. *J. Cereal Sci.*, 4:13-21
- Morrison, W.R., Tester, R.F., Gidley, M.J., Karkalas, J., 1993b. Resistance to acid hydrolysis of lipid-complexed amylose and lipid-free amylose in lintnerised waxy and non-waxy barley starches. *Carbohydr. Res.*, 245: 289-302
- Morrison, W.R., Tester, R.F., Snape, C.E., Law, R., Gidley, M., 1993a. Swelling and gelatinization of cereal starches. IV. Some effects of lipid-complexed amylose and amylose free in waxy and normal barley starches. *Cereal Chem.*, 70 (4): 385-391
- Moss, H.J., Miskelly, D.M., 1984. Variation in starch quality in Australian flour. *Food Technol. Austr.*, 36(2): 90-91
- Moss, R., 1972. A study of the microstructure of bread doughs. *CSIRO, Food Res. Quart.*, 32, 50-56

- Muhrbeck, P., Eliasson, A.C., 1987. Influence of pH on the viscoelastic properties of starch gels. A comparison of potato and cassava starches. *Carbohydr. Polym.*, 7:291
- Navickis, L.L., R.A. Anderson, R.A., Bagley, E.B., Jasberg, B.K., 1982. Viscoelastic properties of wheat flour doughs: Variation on dynamic moduli with water and protein content. *J. Texture Stud.*, 13: 249-264
- Neukom, H., Geissman, T., Painter, T.J., 1967. New aspects of the functions and properties of the soluble wheat flour pentosans. *Baker's Dig.*, 41(5):52
- Neukom, H., Kluendig, W., Neukom, H., 1962. The soluble wheat flour pentosans. *Cereal Sci. Today*, 7:112
- Nishiyama, J., Kuninori, T., Matsumoto, H., Hyono, A., 1981. *Agric. Biol. Chem.*, 45:1953
- Noel, T.R., Ring, S.G., Whittam, M.A., 1993. Physical properties of starch products: structure and function. in *"Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties"*. E. Dickinson e P.Walstra (Eds), Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 126-137
- Okechukwu, P.E., Rao, M.A., 1995. Influence of granule size on viscosity of cornstarch suspension. *J. Texture Stud.*, 26:501-516
- Olcott, H.S., Mecham, D.K., 1947. Characterization of wheat gluten. I. Protei-lipid complex formation during doughing of flours. Lipoprotein nature of the glutenin fraction. *Cereal Chem.*, 24: 407-414
- Orth, R.A., Bushuk, W.A., 1972. A comparative study of the proteins of wheat of diverse baking qualities. *Cereal Chem.*, 49:126-135
- Osborne, T.B., 1907. The proteins of the wheat kernel. Publication 84 of the Carnegie Institution Washington, USA
- Oudgenoeg, G., Hilhorts, H., Piersma, S., Boeriu, C.G., Gruppen, H., Hessing, M., Voragen, A., Laane, C., 2001, Peroxidase-mediated cross-linking of a tyrosine-containing peptide with ferulic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 2503-2510
- Parker, N.S., Hibberd, G.E., 1974. The interpretation of dynamic measurements on non-linear viscoelastic materials. *Rheol. Acta*, 13:910

- Patil, S.K., Finney, K.F., Shogren, M.D., Tsen, C.C., 1976. Water-soluble pentosans of wheat flour. III. Effect of water soluble pentosans on loaf volume of reconstituted gluten and starch doughs. *Cereal Chem.*, 53: 347-354
- Patil, S.K., Tsen, C.C., Lineback, D.R., 1975. Water-soluble pentosans of wheat flour. I. Viscosity properties and molecular weights estimated by gel filtration. *Cereal Chem.*, 52: 44-56
- Payne, P.I., 1987. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on breadmaking quality. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 38:141-153
- Payne, P.I., Corfield, K., G., 1979. Subunit composition of wheat glutenin proteins, isolated by gel filtration in a dissociating medium. *Planta* 145:83-88
- Payne, P.I., Corfield, K., G., Holt, L.M., Blackman, J.A., 1981. Correlations between the inheritance of certain high-molecular weight sub-units of glutenin and breadmaking quality in progenies of six crosses of bread wheat. *J. Sci. Food Agric.*, 32:51-60
- Payne, P.I., Holt, L.M., Jarvis, M.G., Jackson, E.A., 1985. Two dimensional fractionation of the endosperm proteins of bread wheat (*Triticum aestivum*). *J. Cereal Sci.*, 4:217-223
- Payne, P.I., Nightingale, M.A., Krattiger, A.F., Holt, L.M., 1987. The relationship between HMW glutenin subunit composition and bread making quality of British-grown wheat varieties. *J. Sci. Food Agric.*, 38:5-65
- Perlin, A.S., 1951a. Isolation and composition of the soluble pentosans from wheat flour. *Cereal Chem.*, 28: 370-381
- Perlin, A.S., 1951b. Structure of the soluble pentosans from wheat flour. *Cereal Chem.*, 28: 382-393
- Petrofsky, K.E., Hoseney, R.C., 1995. Rheological properties of dough made with starch and gluten from several cereal starches. *Cereal Chem.*, 72 (1): 53-58
- Phan-Thien, N., Safari-Ardi, M., 1998. Linear viscoelastic properties of flour-water doughs at different water concentrations. *J. Non-Newtonian Fluid Mech.*, 74:137-150
- Phan-Thien, N., Safari-Ardi, M., Morales-Patiño, A., 1997. Oscillatory and simple shear flows of a flour-water dough: a constitutive model. *Rheol. Acta*, 36:38-48.

- Pomeranz, Y., Meyer, D., Seibel, W., 1984. Wheat, wheat rye and rye dough and bread studied by scanning electron microscopy. *Cereal Chem.*, 61:53-59
- Pomeranz, Y., Williams, P.C., 1990. Wheat hardness: Its genetic, structural and biochemical background, measurement and significance. *Adv. Cereal Sci. Technol.*, 10: 471-548
- Popineau, Y., Bonenfant, S., Cornec, M., Pezolet, M., 1994a. A study by infrared spectroscopy of the deformations of gluten proteins differing in their gliadin and glutenin compositions. *J. Cereal Sci.*, 20:15-22
- Popineau, Y., Cornec, M., Lefebvre, J., Marchylo, B., 1994b. Influence of high Mr glutenin subunits on glutenin polymers and rheological properties of glutes and gluten fractions of near-isogenic lines of wheat Sicco. *J. Cereal Sci.*, 19: 231-241
- Popineau, Y., Pineau, F., 1988. Changes of conformation and surface hydrophobicity of gliadins. *Lebensm. Wissen. Technol.*, 21:113
- Preston, K.R., 1998. Protein-carbohydrate interactions. in *“Interactions: The Keys to Cereal Quality”* Rob J. Hammer and R. Carl Hoseney eds, AACC, St Paul, USA
- Purcell, J.M., Kasarda, D.D., Wu, C-S.C., 1988. Secondary structures of wheat alpha and omega-gliadin proteins: Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Cereal Sci.*, 7: 21-32
- Rao, M.A., Okechukwu, P.E., Da Silva, P.M.S., Oliveira, J.C., 1997. Rheological behavior of heated starch dispersions in excess water: role of starch granule. *Carbohydr. Polym.*, 33: 273-283
- Räsänen, J., Blanshard, J.M.V., Siitari-Kaupi, M., Autio, K., 1997. Water distribution in frozen lean wheat doughs. *Cereal Chem.*, 74(6):806-813
- Regina, A., Sharp, P.J., Morell, M., 1996. Variation in amylose content in wheat. in *“Wheat Breeding Society of Australia” -Proceedings of the Eighth Assembly*, Canberra, pp.64-67
- Renard, C.M.G.C., Rouau, X., Thibault, J.F., 1990. Structure and properties of water soluble pentosans of wheat flour. *Science des Aliments*, 10(2): 283-292

- Richard, G., Tuner, M.P.F., Napier, J.A., Shewry, P.R., 1996. Transport and deposition of prolamins. *Plant Physiol. Biochem.*, 34(2): 237-243
- Ring, S.G., 1985. Some studies on starch gelation. *Starch/Stärke*, 37(3): 80-83
- Ring, S.G., Collona, P., L'Anson, K.J., Kalichevsky, M.T., Miles, M.J., Morris, V.J., Orford, P.D., 1987. The gelation and crystallization of amylopectin. *Carbohydr. Res.*, 162: 277-293
- Roels, S.P., Cleemput, G., Vandewalle, M., Nys, M., Delcour, J.A., 1993. Bread volume and potential of variable-quality flours with constant protein levels as determined by factors governing mixing time and baking absorption levels. *Cereal Chem.*, 79(3): 318-323
- Roels, S.P., Collado, M., Lossveld, A.-M., Grobrt, P.J., Delcour, J.A., 1999. Variation in the degree of D-xylose substitution in water-extractable european durum wheat (*Triticum durum* desf.) semolina arabinoxylans. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 1813-1816
- Rojas, J.A., Rosell, C.M., Benedito de Barber, C., 1999. Pasting properties of different wheat flour-hydrocolloid systems. *Food Hydrocolloids*, 13: 27-33
- Rolee, A., Le Meste, M., 1997. Thermomechanical behavior of concentrated starch-water preparations. *Cereal Chem.*, 74(5): 581-588
- Rolee, A., Le Meste, M., 1999. Effect of moisture content on thermomechanical behavior of concentrated wheat starch-water preparations. *Cereal Chem.*, 76(3): 452-458
- Rosell, C.M., Rojas, J.A., Benedito de Barber, C., 2001. Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocolloid*, 15:75-81
- Ross, A.S., MacRitchie, F., 1995. Interactions of wheat proteins, carbohydrates and lipids, in *Ingredient interactions: effects on food quality*. Anilkumar G. Gonkar (ed), Marcell Dekker, NY, USA, pp 321-355
- Ross-Murphy, S.B., 1995. Rheological characterisation of gels. *J. Texture Stud.*, 26: 391-400.
- Ross-Murphy, S.B., 1984. "*Biophysical Methods in Food Research*", H.W.-S. Chan (Ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 138-199

- Rouau, X., Hayek, M-L., Moreau, D., 1994. Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread-making quality of flours in relation to changes in pentosan properties. *J. Cereal Sci.*, 19:259-272
- Rouau, X., Moreau, D., 1993. Modification of some physicochemical properties of wheat flour pentosans by an enzyme complex recommended for baking. *Cereal Chem.*, 70 (6):626-632
- Roubroeks, J.P., Andersson, R., Åman, P., 2000. Structural features of (1-3),(1-4)-beta-D-glucan and arabinoxylann fractions isolated from rye bran. *Carbohydr. Polym.*, 42:3-11
- Roulet, P., MacInnes, W.M., Wursch, P., Sanchez, R.M., Raemy, A., 1988. A comparative study of retrogradation kinetics of gelatinized wheat starch in gel and powder form using X-rays, differential scanning calorimetry and dynamic mechanical analysis. *Food Hydrocolloids*, 2 (5):381-396
- Roussel, P., 1993. Influence des conditions de pétrissage sur les caractéristiques des pâtes et des pains en panification française. *Industries des Céréales*, 83: 10-20
- Russell, P.L. 1983, *J. Cereal Sci.*, 1:297
- Sacco, A., Bolsi, I.N., Massini, R., Spraul, M., Humpfer, E., Ghelli, S., 1998. Preliminary Investigation on the characterization of durum wheat flours coming from some areas of south Italy by means of ¹H High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance. *J. Agric. Food Chem.*, 46 (10):4242-4249
- Sajjan S.U., Rao, M.R.R., 1987. Effect of hydrocolloids on the rheological properties of wheat starch. *Carbohydr. Polym.*, 7: 395-402.
- Sandstedt, R.M., Schaumburg, L., Flemming, J., 1954. The microstructure of bread and dough. *Cereal Chem.*, 31:43-49
- Sandstedt, R.M., 1961. The function of starch in the baking of bread. *Baker's Dig.*, 35 (5): 36
- Sandstedt, R.M., Schroeder, H., 1969. A photomicrographic study of mechanically damaged starch. *Food Technol.* 14:257-265

- Sapirstein, H.D., Fu, B.X., 2000. Evidence for varying interaction of gliadin and glutenin proteins as an explanation for differences in dough strength of different wheats. in "*Wheat Gluten*" - P.R. Shewry e A.S. Tatham (Eds.), Royal Society of Chemistry, Cambridge UK, pp. 425-429
- Sasaki, T., Yasui, T., Matsuki, J., 2000. Influence of non-starch polysaccharides isolated from wheat flour on the gelatinization and gelation of wheat starches. *Food Hydrocolloids*, 14: 295-303
- Schaich, K.M., Rebello, C.A., 1999. Extrusion chemistry of wheat flour proteins: I. Free radical formation. *Cereal Chem.*, 76(5):748-755
- Schofield, D., Baianu, I.C., 1982. Solid-state, cross-polarization magic-angle spinning carbon-13 nuclear magnetic resonance and biochemical characterization of wheat proteins. *Cereal Chem.*, 59(4): 240-245
- Schofield, J.D., 1994. Wheat proteins: structure and functionality in milling and breadmaking. in "*Wheat: production, properties and quality*", W. Bushuk and V.F. Rasper (Eds) Blackie Academic and Professional, Glasgow, pp. 73-106
- Schofield, J.D., Bottomley, R.C., Timms, M.F., Booth, M.R., 1983. The effect of heat on wheat gluten and the involvement of sulphydryl-dissulfide interchange reactions. *J. Cereal Sci.*, 1: 241-253
- Schofield, J.D., Greenwell, P., 1987. Wheat starch granule proteins and their technological evidence. in "*Cereals in a European Context*", I. D. Morton (Ed.), VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim and Ellis Horwood, Chichester, pp.407-420
- Schofield, R.K., Scott Blair, G.W., 1932. The relationship between viscosity, elasticity, and plastic strength of soft materials as illustrated by some mechanical properties of flour doughs. I. *Proc. Roy. Soc. (London)*, 138:707-718
- Schooneveld-Bergmans, M.E.F., Dijk, Y.M., Beldman, G., Voragen, A.G.J., 1999. Physicochemical characteristics of wheat bran glucuronarabinoxylans. *J. Cereal Sci.*, 29:49-61
- Schropp, P., Wieser, H., 1996. Effects of high molecular weight subunits of glutenin on the rheological properties of wheat gluten. *Cereal Chem.*, 73(3):410-413

- Selvendran, R.R., March, J.F., Ring, S.G., 1979. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. *Anal. Biochem.*, 96:282-292
- Sharma, N., 1990. Modeling flow behavior of flour-water doughs. Dissertation, University of Nebraska: Lincoln, NE.
- Shewry, P.R., 1995. Plant storage proteins (review). *Biological Reviews of the Cambridge Philos. Soc.*, 70(3): 375-426
- Shewry, P.R., Halford, N.G., Tatham, A.S., 1992. The high molecular weight subunits of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.*, 15:105-120
- Shewry, P.R., Napier, J.A., Tatham, A.S., 1995a. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant Cell*, 7:945-956
- Shewry, P.R., Tatham, A.S., 1987. Recent advances in our understanding of cereal seed protein structure and functionality. *Comments Afric. Food Chem.*, 1(2): 71-94
- Shewry, P.R., Tatham, A.S., 1997. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *J. Cereal Sci.*, 25:207-227
- Shewry, P.R., Tatham, A.S., Barro, F., Barcelo, P., Lazzeri, P., 1995b. Biotechnology of breadmaking: Unraveling and manipulating the multi-protein gluten complex – Review. *Biotechnology*, 13: 1185-1190
- Shewry, P.R., Tatham, A.S., Forde, J., Kreis, M., Mifflin, B., 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. *J. Cereal Sci.*, 4: 97-106
- Shluentz, E.J., Steffe, J.F., Ng, P.K.W., 2000. Rheology and microstructure of wheat dough developed with controlled deformation. *J. Texture Stud.*, 31:41-54
- Simmonds, D.H., Barlow, K.K., Wrigley, C.W., 1973. Chemical basis of grain hardness in wheat. *Cereal Chem.*, 50: 561
- Singh, N.K., Shepherd, K.W., 1988. Linkage mapping of the genes controlling endosperm proteins in wheat. 1. Genes on the short arms of group 1 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.*, 66:628-641
- Singh, N.K., Shepherd, K.W., Cornish, G.B., 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *J. Cereal Sci.*, 14:203-208

- Slade, L., Levine, H., 1994. Water and the glass transition – dependence of the glass transition on composition and chemical structure: special implications for flour functionality in cookie baking, *J. Food Eng.*, 22:143
- Smith, J.R., Smith, T.L., Tschoegl, N.W., 1970. Rheological properties of wheat flour doughs. III- Dynamic shear modulus and its dependence on amplitude, frequency, and dough composition. *Rheol. Acta*, 9(2): 239-252
- South, J.B., Morrison, W.R., Nelson, O.E., 1991. A relationship between the amylose and lipid contents of starches from various mutants for amylose content in maize. *J. Cereal Sci.*, 14: 267-278
- Steffe, J.F., 1996. *“Rheological Methods in Food Process Engineering”* James F. Steffe, ed, Freeman Press, USA
- Stevens, D.J., Elton, A.H., 1971. Thermal properties of the starch/water system – part I. Measurement of heat of gelatinization by differential scanning calorimetry. *Starch/Stärke*, 23 (1): 8-11
- Stoddard, F.L., 1999. Survey of particle size distribution in wheat and related species. *Cereal Chem.*, 76(1):145-149
- Sudhakar, V., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R., 1996. Starch-galactomannan interactions: functionality and rheological aspects. *Food Chem.*, 55(3): 259-264.
- Svegmark, K., Hermanson, A.M., 1990. Shear induced changes in the viscoelastic behaviour of heat treated potato starch dispersions. *Carbohydr. Polym.*, 14:29-32
- Svegmark, K., Hermanson, A.M., 1991. Changes induced by shear and gel formation in the viscoelastic behaviour of potato, wheat and maize starch dispersions. *Carbohydr. Polym.*, 15: 151-169
- Svegmark, K., Kidman, S., Hermansson, A.M., 1993. Molecular structures from mixed amylose potato starch dispersions and their rheological behaviour. *Carbohydr. Polym.*, 22:19-29
- Swinkels, J.J.M., 1985. Composition and properties of commercial native starches. *Starch/Stärke*, 37(1): 1-5

- Szczesniak, A.S., Loh, J., Mannel, W.R., 1983. Effect of moisture transfer on dynamic viscoelastic parameters of wheat flour/water systems. *J. Rheol.*, 27:6, 537-556
- Tanner, S.F., Ring, S.G., Whittam, M.A., Belton, P.S., 1987. High resolution solid-state ^{13}C NMR study of some $\alpha(1,4)$ linked glucans: the influence of water on structure and spectra. *Int. J. Biol. Macromol.*, 9:219-224
- Tao, H.P., Adalsteins, A.E., Kasarda, D.D., 1992. Intermolecular disulfide bonds link specific HMW glutenin subunits in wheat endosperm. *Biochim. Biophys. Acta*, 1159:13-21
- Tao, H.P., Kasarda, D.D., 1989. Two-dimensional gel mapping and N-terminal sequencing of LMW-glutenin subunits. *J. Exp. Bot.*, 40:1015-1020
- Tatham, A.S., Field, J.M., Smith, S.J., Shewry, P.R., 1987. The conformation of wheat gluten proteins, II - Agregated gliadins and LMW subunits of glutenin. *J. Cereal Sci.*, 5(3):202-214
- Tatham, A.S., Mifflin, B.J., Shewry, P.R., 1985a. The beta-turn conformation in wheat gluten proteins: relationship to gluten elasticity. *Cereal Chem.*, 62(5): 405-412
- Tatham, A.S., Shewry, P.R., 1985. The conformation of wheat gluten proteins. The Secondary structures and thermal stabilities of alpha, beta, gama and omega-gliadins. *J. Cereal Sci.*, 3: 103-113
- Tatham, A.S., Shewry, P.R., 1995. The S-poor prolamins of wheat, barley and rye - Mini Review. *J. Cereal Sci.*, 22: 1-16
- Tatham, A.S., Shewry, P.R., Belton, P.S., 1985b. ^{13}C -NMR study of C hordein. *Biochem. J.*, 232: 617-620
- Tatham, A.S., Shewry, P.R., Belton, P.S., 1990. Stuctural studies of cereal prolamins, including wheat gluten. in "*Advances in Cereal Science and Technology*", Y. Pomeranz (Ed.), American Association of Cereal Chemists, St.Paul, MN, USA, Vol.10, pp. 1-78
- Tatham, A.S., Shewry, P.R., Mifflin, B., 1984. Wheat gluten elasticity: a similar molecular basis to elastin?. *FEBS Lett.*, 177 (2): 205-208

- Tester, R.F., 1997. Starch: The polysaccharide fractions. in “*Starch - Structure and Functionality*” Frazier PJ, Richmond R, Donald AM (Eds), London, UK: The Royal Society of Chemistry, p 163-171.
- Tester, R.F., Karkalas, J., Qi, X., 2004. Starch-composition, fine structure and architecture. *J. Cereal Sci.* 39:151-165
- Tester, R.F., Morrison, W.R., 1990. Swelling and gelatinisation of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose and lipids. *Cereal Chem.*, 67 (6): 551-557
- Thebaudin, J-Y., Lefebvre, A-C., Davenel, A., 1998. Determination of the cooking rate of starch in industrial sauces: comparison of nuclear magnetic resonance relaxometry and rheological methods. *Science des Aliments*, 18: 283-291
- Thomson, N.H., Miles, M.J., Tatham, A.S., Shewry, P.R., 1992. Molecular images of cereal proteins by STM. *Ultramicroscopy*, 42-44: 118-1122
- Tojo, E., Prado, J., 2003. A simple ^1H NMR method for the quantification of carrageenans in blends. *Carbohydr. Polym.*, 53(3):325-329
- Tsiami, A.A., Bot, A., Agterof, W.G.M., Groot, R.D., 1997. Rheological properties of glutenin subfraction in relation to their molecular weight. *J. Cereal Sci.*, 26: 15-27
- Tung, M.A., Paulson, A.T., 1995. Rheological concepts for probing ingredient interactions in food systems. in “*Ingredient interactions: Effects on food quality*” A. Gaonka (Ed.), Marcel Dekker, N.Y.
- Turhan, M., Gunasekaran, S., 2002. Kinetics of in situ and in vitro gelatinization of hard and soft wheat starches during cooking in water. *J. Food Eng.*, 5:1-7
- Udy, D.C., 1957. Interactions between proteins and polysaccharides of wheat flour. *Cereal Chem.*, 34: 37-46
- Uthayakumaran, S., Gras, P.W., Stoddard, F.L., Bekes, F., 1999. Effect of varying protein content and glutenin-to-gliadin ratio on the functional properties of wheat dough. *Cereal Chem.*, 76(3): 389-394
- Uthayakumaran, S., Newberry, M., Keentok, M., Stoddard, F.L., Bekes, F., 2000. Basic rheology of bread dough with modified protein content and glutenin-to-gliadin ratios. *Cereal Chem.*, 77(6): 744-749

- Vakar, A., Pupyanskii, A.J., Semenova, L.V., 1965. The influence of D₂O on the physical properties of gluten and wheatb dough. *Prikl. Biochim. Mikrobiol.*, 1:25
- Van de Velde, F., Knutsen, S.H., Usov, A.I., Rollema, H.S., Cerezo, A.S., 2002. ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. *Trends Food Sci. Techn.*, 13(3):73-92
- Vanhamel, S., Cleemput, G., Delcour, J.A., Darius, P.L., 1993. Physicochemical and functional properties of rye nonstarch polysaccharides. IV. The effect of HMW water-soluble pentosans on wheat-bread quality in a straight-dough procedure. *Cereal Chem.*, 70 (3): 306-311
- Veregin, R. P., Fyfe, C.A., Marchessault, R.H., Taylor, M.G., 1986. Characterization of the crystalline A and B starch polymorphs and investigation of starch crystallization by high resolution ¹³C CP/MAS NMR. *Macromolecules*, 19: 1030
- Vink, C.J.A., Stevens, I., Gruppen, H., Grobet, P.J., Delcour, J.A, 1995. Physicochemical and functional properties of rye nonstarch polysaccharides. VI. Variability in the structure of water-unextractable arabinoxylans. *Cereal Chem.*, 72(2): 411-418
- Vinkx, C.J.A., Reynaert, H.R., Grobet, P.J., Delcour, J.A., 1993. Physicochemical and functional properties of rye nonstarch polysaccharides. V. Variability in the structure of water-soluble arabinoxylans. *Cereal Chem.*, 70(3): 311-317.
- Vinkx, C.J.A., Van Nieuwenhove, Delcour, J.A., 1991. Physicochemical and functional properties of rye nonstarch polysaccharides. III. Oxidative gelation of a fraction containing water-soluble pentosans and proteins. *Cereal Chem.*, 68(6): 617-622
- Vold, R.L., Waugh, J.S., Klein, M.P., Phelps, D.E., 1968. Measurement of spin relaxation in complex systems. *J. Chem. Phys.*, 48:3831
- Wang, C.F., Kokini, J.L., 1995. Prediction of the nonlinear viscoelastic properties of gluten doughs. *J. Food Eng.*, 25: 297-309
- Wang, F.C., Sun, X.S., 2002. Creep-recovery of wheat flour doughs and relationship to other physical dough tests and breadmaking performance. *Cereal Chem.*, 79(4):567-571

- Wang, M., Hamer, R.J., van Vliet, T., Oudgenoeg, G., 2002. Interaction of water extractable pentosans with gluten protein: effect on dough properties and gluten quality. *J. Cereal Sci.*, 36 (1): 25-37
- Weegels, C.W., du Cros, D.L., Verhoek, J.A., Hamer, R.J., 1994. Effects on gluten of heating at different moisture contents. I. Changes in physico-chemical properties. *J. Cereal Sci.*, 19:31-38
- Weegels, P.L., Hamer, R.J., Schofield, J.D., 1996. Functional properties of wheat glutenin - Critical Review. *J. Cereal Sci.*, 23: 1-18
- Wehrle, K., Grau, H., Arendt, E.K., 1997. Effects of lactic acid, acetic acid, and table salt on fundamental rheological properties of dough. *Cereal Chem.*, 74(6): 739-744
- Whistler, R.L., BeMiller, J.N., 1997. "*Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*" Roy L. Whistler and James N. BeMiller (eds.), Eagen Press, St Paul, MN, USA
- Windle, J.J., Evans, J.J., 1971. Electron spin resonance study of stable free radicals in wheat. *Cereal Chem.*, 48:351-355
- Windle, J.J., Nimmo, C.C., Lew, R.J.-L., 1976. The effects of dough formation and baking on iron enrichment of bread as studied by electron paramagnetic resonance. *Cereal Chem.*, 53:671-677
- Wishart, D.S., Bingham, C.G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H.J., Oldfield, E., Markley, J.L., Sykes, B.D., 1995. ^1H , ^{13}C , and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR*, 6: 135-140
- Worlow, R.W., 1980. *Rheological Techniques*. R.W. Worlow (Ed), Ellis Horwood Ltd, UK
- Wrigley, C.W., Andrews, J.L., Bekes, F., Gras, P.W., Gupta, R.B., MacRitchie, F., Skerritt, J.H., 1998. Protein-protein interactions – essential to dough rheology, in "*Interactions: The Keys to Cereal Quality*", Rob J. Hamer and R. Carl Hoseney eds, American Association of Cereal Chemists Inc., St Paul, MN, USA, pp. 17-46
- Wu, J.Y., Bryant, R.G., Eads, T.M., 1992. Detection of solidlike components in starch using cross-relaxation and fourrier transform wide-line ^1H NMR methods. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 449-455

- Wüthrich, K., 1986. in "*NMR of proteins and nucleic acids*". K. Wüthrich (Ed.), J. Wiley, ed., NY
- Yang, W.H., Rao, M.A., 1998. Complex viscosity-temperature master curve of cornstarch dispersion during gelatinisation. *J. Food Proc. Eng.*, 21: 191-207
- Yeh, Y.F., Hoseney, R.C., Lineback, D.R., 1980. Changes in wheat flour pentosans as a result of dough mixing and oxidation. *Cereal Chem.*, 57 (2):144-148
- Yin, Y., Walker, C.E., 1992. Pentosans from gluten-washing waste-water: isolation, characterizations, and role in baking. *Cereal Chem.*, 69 (6): 592-596
- Yoshimura, M., Takaya, T., Nishinari, K., 1996. Effects of konjac-glucomannan on the gelatinization and retrogradation of corn starch as determined by rheology and differential scanning calorimetry. *J. Agric. Food Chem.*, 44:2970-2976
- Zawistowska, V., Békés, F., Bushuk, W., 1985. Gluten proteins with high affinity to flour lipids. *Cereal Chem.*, 62:284
- Zelevnak, K.J., Hoseney, R.C., 1986. The role of water in the retrogradation of wheat starch gels and bread crumb. *Cereal Chem.*, 63(5): 407-411.
- Zeng, M., Morris, C.F., Batey, I.L., Wrigley, C.W., 1997. Sources of variation for starch gelatinization, pasting and gelation properties in wheat. *Cereal Chem.*, 74 (1): 63-71
- Zobel, H.F., Stephen, A.M., 1995. Starch: structure, analysis and application. in "*Food Polysaccharides and Their Application*", Alistair M. Stephen (Ed.), Marcel Dekker, Inc., Ny, pp 19-66